

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Bedeutung der genetischen Polymorphismen in den Enzymen CYP2D6, CYP2C19 und CYP2C9 für Pharmakokinetik der trizyklischen Antidepressiva Doxepin und Trimipramin

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

von Gunnar Müller

aus Waldshut

Abstract (ger)

Mehrere Studien wiesen eine Beteiligung der Enzyme CYP2D6, CYP2C19 und CYP2C9 am Metabolismus von trizyklischen Antidepressiva nach. Wir untersuchten die Auswirkungen genetischer Polymorphismen dieser Enzyme auf die Pharmakokinetik von E-, Z-Doxepin und Trimipramin beim Menschen. Eine einzelne orale Dosis von jeweils 75 mg Trimipramin und Doxepin wurde 42 gesunden Probanden verabreicht, die als Schnell- (EM), Intermediär- (IM) und Langsammetabolisierer (PM) von CYP2D6- und CYP2C19-Substraten und als Langsammetabolisierer mit dem CYP2C9-Genotyp $*3/*3$ genotypisiert worden waren. Die Substrate sowie ihre aktiven Metaboliten wurden mittels HPLC im Plasma gemessen, Daten wurden mit nonparametrischen pharmakokinetischen Methoden analysiert und statistisch ausgewertet. Die mittlere E-Doxepin-Clearance (95%-KI) betrug 406 (390-445), 247 (241-271) und 127 (124-139) l/h bei CYP2D6-EMs, -IMs und -PMs und war auch bei Trägern des CYP2C9 $*3/*3$ -Genotyps signifikant niedriger (238 l/h). CYP2C19 beeinflusste die orale Clearance von Z-Doxepin um das 2,5-fache (73 l/h in CYP2C19-PMs verglichen mit 191 l/h bei EMs). Die AUC (0-48h) des aktiven Metaboliten Desmethyldoxepin war vom CYP2D6-Genotyp abhängig mit einem Median von 5,28, 1,35 und 1,28 nmol/l*h bei CYP2D6-PMs, -IMs und -EMs. Die mittlere orale Trimipramin-Clearance betrug 276 l/h (180-444) in der Referenzgruppe aber nur 36 l/h (24-48) bei CYP2D6-PMs. Die AUC von Desmethyltrimipramin war 40-fach höher bei CYP2D6-PMs als bei EMs (1,7 verglichen mit 0,04 mg/l*h bei EMs), aber unter der Nachweisgrenze bei den meisten Probanden mit CYP2C19- oder CYP2C9-Defizienz. Der CYP2D6-Polymorphismus wies eine starke Auswirkung auf die Pharmakokinetik von E-Doxepin und Trimipramin sowie eine ausgeprägte Stereoselektivität bei der Biotransformation von Doxepin auf. CYP2D6-PMs sind möglicherweise einem erhöhten Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen ausgesetzt bei der Behandlung mit den empfohlenen Dosen dieser Antidepressiva.

CYP2D6

CYP2C9

CYP2C19

Doxepin

Trimipramin

Genetischer Polymorphismus

Pharmakokinetik

Abstract (eng)

Several studies have demonstrated involvement of the enzymes CYP2D6, CYP2C19 and CYP2C9 in the metabolism of tricyclic antidepressants. We studied the effects of genetic polymorphisms in these enzymes on E-,Z-doxepin and trimipramine pharmacokinetics in humans. A single oral dose of each 75 mg trimipramine and doxepin was given to 42 healthy volunteers genotyped as extensive (EM), intermediate (IM) and poor (PM) metabolizers of substrates of CYP2D6 and of CYP2C19 and as slow metabolizers with the CYP2C9 genotype $*3/*3$. E-,Z-doxepin and -desmethyldoxepin as well as trimipramine and desmethyltrimipramine were quantified in plasma by HPLC. Data were analyzed by non-parametric pharmacokinetics and statistics. Mean E-doxepin clearance (95% confidence interval) was 406 (390-445), 247 (241-271) and 127 (124-139) l/h in EMs, IMs and PMs of CYP2D6 and was also significantly lower in carriers of CYP2C9 $*3/*3$ (238 l/h). CYP2C19 was involved in Z-doxepin metabolism with 2.5-fold differences in oral clearances (73 l/h in CYP2C19 PMs compared with 191 l/h in EMs). The AUC (0-48 h) of the active metabolite desmethyldoxepin was dependent on CYP2D6 genotype with a median of 5.28, 1.35 and 1.28 nmol/l*h in PMs, IMs and EMs of CYP2D6. The genetically polymorphic enzymes exhibited highly stereoselective effects on doxepin biotransformation in humans. The median oral clearance of trimipramine was 276 l/h (180-444) in the reference group but only 36 l/h (24-48) in CYP2D6-PMs. The AUC of desmethyltrimipramine was 40-fold greater in CYP2D6 PMs than in the reference group (1.7 vs. 0.04 mg/l*h in EMs), but below the quantification limit in most carriers of deficiencies of CYP2C19 or CYP2C9. The CYP2D6 polymorphism had a strong impact on E-doxepin and trimipramine pharmacokinetics and CYP2D6-PMs might be at an elevated risk for adverse drug effects when treated with common recommended doses of these antidepressants.

CYP2D6

CYP2C9

CYP2C19

doxepine

trimipramine

genetic polymorphisms

pharmacokinetics

Dekan: Prof. Dr. M. Paul

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Kirchheiner
2. Priv.-Doz. Dr. med. A. Ströhl
3. Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Meisel

Datum der Promotion: 21.11.2005

Meinen Eltern Heide und Gerhard Müller

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1	Trizyklische Antidepressiva.....	1
1.1.1	Einführung und Bedeutung der trizyklischen Antidepressiva	1
1.1.2	Wirkungsweise und Indikation von trizyklischen Antidepressiva	2
1.1.3	Nebenwirkungen von Doxepin	5
1.1.4	Nebenwirkungen von Trimipramin	6
1.1.5	Pharmakokinetik von Doxepin	6
1.1.6	Pharmakokinetik von Trimipramin	8
1.2	Das Cytochrom P-450-Enzysystem.....	9
1.3	Das Enzym Cytochrom P-450-2D6.....	11
1.3.1	Das Cytochrom P-450-2D6 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel	11
1.3.2	Genetische Polymorphismen von Cytochrom P-450-2D6	13
1.4	Das Enzym Cytochrom P-450-2C9.....	15
1.4.1	Das Cytochrom P-450-2C9 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel	15
1.4.2	Genetische Polymorphismen von Cytochrom P450-2C9	17
1.5	Das Enzym Cytochrom P-450-2C19.....	19
1.5.1	Das Cytochrom P-450-2C19 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel	19
1.5.2	Genetische Polymorphismen von Cytochrom P450-2C19	20
1.6	Herleitung der Aufgabenstellung	21
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	23
2.1	Probandenrekrutierung und Studiendurchführung.....	23
2.1.1	Studiendesign	23
2.1.2	Probandenauswahl und Einschlusskriterien	23
2.1.3	Ausschlusskriterien	24
2.1.4	Art und Dosis der verwendeten Arzneimittel	25
2.1.5	Diätetische Maßnahmen	25
2.1.6	Überprüfung der Probandencompliance und Vorsichtsmaßnahmen	26
2.1.7	Studienablauf	26
2.1.8	Erfassung von Nebenwirkungen	27
2.1.9	Dokumentation der Studie	27
2.1.10	Datenschutz und Vertraulichkeit der Daten	27
2.1.11	Fehlerminimierung	27
2.1.12	Versicherungsschutz	28

2.1.13	Weiterverarbeitung und Aufarbeitung der Proben zur Messung der Medikamentenplasmakonzentration	28
2.2	Genotypisierung.....	28
2.2.1	Erythrozytenlyse	28
2.2.2	DNA-Extraktion	29
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)	30
2.2.5	Bestimmung des Cyp2D6-Allels durch PCR-RFLP-Tests	31
2.2.6	Bestimmung des CYP2C9-Allels durch PCR-RFLP-Tests	32
2.2.7	Bestimmung des CYP2C19-Allels durch PCR-RFLP-Tests	33
2.3	Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse.....	35
2.3.1	Prinzip der Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse	35
2.3.2	HPLC von Doxepin und N-Desmethyldoxepin	36
2.3.3	HPLC der E- und Z-Isomere von Doxepin	37
2.3.4	HPLC von racemischen Trimipramin	38
2.4	Analyse der Messdaten und Statistik.....	39
2.4.1	Pharmakokinetische Begriffe und Parameter	39
2.4.2	Analyse der Messdaten	40
2.4.3	Statistik	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Ergebnisse für Doxepin.....	42
3.1.1	Pharmakokinetik von Doxepin und N-Desmethyldoxepin in Abhängigkeit vom Genotyp	42
3.1.2	Pharmakokinetik der E- und Z-Isomere von Doxepin in Abhängigkeit vom Genotyp	44
3.2	Ergebnisse für Trimipramin	47
3.2.1	Pharmakokinetik von Trimipramin in Abhängigkeit vom Genotyp	47
3.2.2	Pharmakokinetik von N-Desmethyltrimipramin in Abhängigkeit vom Genotyp	49
4	DISKUSSION	52
4.1	Diskussion der Doxepinergebnisse	52
4.1.1	Auswirkungen des CYP2D6-Polymorphismus auf den Metabolismus von Doxepin	52
4.1.2	Auswirkungen der CYP2C19- und CYP2C9-Polymorphismen auf den Metabolismus von Doxepin	52

4.1.3	Vergleich der gefundenen Daten mit anderen In-vivo- und In-vitro-Studien	53
4.2	Diskussion der Trimipraminergebnisse	55
4.2.1	Auswirkungen des CYP2D6-Polymorphismus auf den Trimipraminmetabolismus	55
4.2.2	Auswirkungen der CYP2C19- und CYP2C9-Polymorphismen auf den Trimipraminmetabolismus	57
4.3	Klinischer Bezug der Ergebnisse	58
4.3.1	Individualisierung der antidepressiven Pharmakotherapie	58
4.3.2	Genotypabhängige Dosisanpassungen für Doxepin und Trimipramin	59
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	62

Abkürzungen

5-HT	Serotonin
Å	Angström
Anti-HCV	Anti-Hepatitis C-Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve)
Beta-HCG	Humanes Chorion-Gonadotropin
bp	Basenpaare
BZ	Blutzucker
bzw	beziehungsweise
C	Celsius
C _{max}	Maximale Konzentration
Cl	Clearance
Cl/F	Clearance/bioverfügbare Fraktion (Orale Clearance)
CRF	Case report form (Fallbericht-Formular)
CYP	Cytochrom P-450-Enzym
CYP1A2	Cytochrom P-450-1A2
CYP3A4	Cytochrom P-450-3A4
CYP2C8	Cytochrom P-450-2C8
CYP2C18	Cytochrom P-450-2C18
CYP2C9	Cytochrom P-450-2C9
CYP2C19	Cytochrom P-450-2C19
CYP2D6	Cytochrom P-450-2D6
CYP2D7	Cytochrom P-450-2D7
CYP2D8	Cytochrom P-450-2D8
d	Tag
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EM	Extensive metabolizer (schneller Metabolisierer)
Et al. (u.a.)	Et alii (und andere)
€	Euro
Fa.	Firma
γ-GT	γ-Glutamyl-Transferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyrovat-Transaminase
h	Stunde

Hb	Hämoglobin
HbsAg	Hepatitis B-surface antigen (Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus)
HIV	Human immunodeficiency virus (Humanes Immundefizienz Virus)
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
IM	Intermediate metabolizer (mittelschneller Metabolisierer)
IS	Interner Standard
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molare Masse
m	Meter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mol	Mol
MPTP	Methyl-phenyl-tetrahydro-pyridin
NA	Noradrenalin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NS	Nicht signifikant
p	Signifikanzniveau (festgelegt auf 0,05)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pKa-Wert	Stärke einer Brønsted-Säure
PM	Poor metabolizer (langsamer Metabolisierer)
REM	Rapid Eye Movement
RFLP	Restriction length fragment polymorphism (Restriktion)

	tionsfragmentlängenpolymorphismus)
RPLC	Reversed phase liquid chromatography (Umkehrphasen-Flüssigkeits-Chromatographie)
RR	Riva-Rocci-Blutdruckwert
SA	Standardabweichung
SNP	Single nucleotide polymorphism
SRS	Substrate recognition site (Substrat-Erkennungsstelle)
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (selektiver Serotoninwiederaufnahme-Hemmer)
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_{\max}	Zeitpunkt des Erreichens der Spitzenkonzentration
TEN-Puffer	Tris EDTA Natriumchlorid Puffer
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
UM	Ultrarapid metabolizer (sehr schneller Metabolisierer)
UV	ultraviolett
v	Volumenanteile
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	Zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Trizyklische Antidepressiva

1.1.1 Einführung und Bedeutung der trizyklischen Antidepressiva

Die pharmakologische Gruppe der trizyklischen Antidepressiva trägt ihren Namen aufgrund zweier Gemeinsamkeiten: dem stimmungsaufhellenden Effekt und der chemischen Grundstruktur mit der charakteristischen Anordnung von 3 Ringen, dem „Trizyklus“. Als Grundsubstanz gilt Imipramin, dessen thymoleptische Eigenschaft 1957 von dem Schweizer Psychiater Kuhn im Rahmen von klinischen Untersuchungen mit potenziellen Psychopharmaka das erste Mal beschrieben worden war. Oftmals nur geringe chemische Veränderungen am siebengliedrigen Zentralring und/oder an der Seitenkette sind verantwortlich für das breite Spektrum an pharmakologischen und klinischen Eigenschaften, die die einzelnen Substanzen charakterisieren und entscheidend für deren Indikation sind.

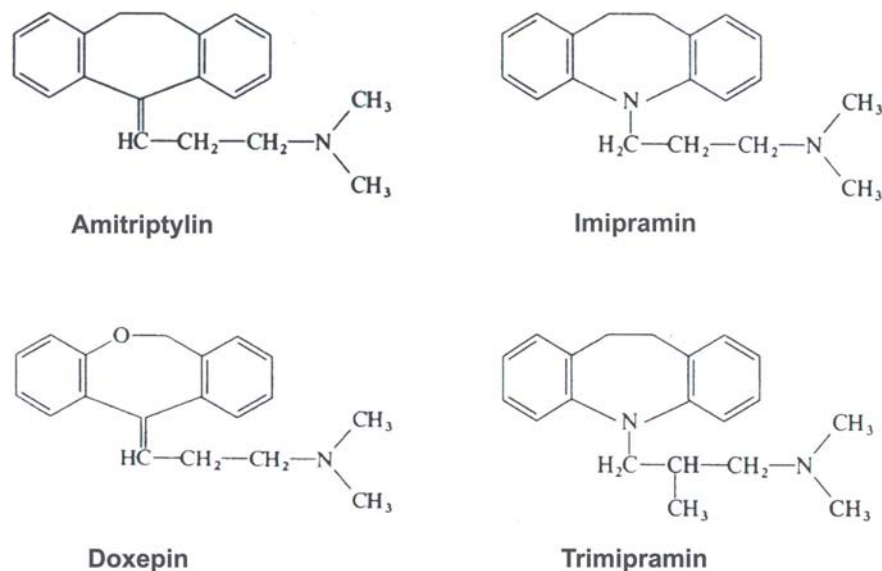


Abbildung 1: Strukturformel der trizyklischen Antidepressiva Amitriptylin, Imipramin, Doxepin und Trimipramin

Antidepressiva gehören zu den meistverschriebenen Psychopharmaka. Die Zahl der Verordnungen in der Bundesrepublik Deutschland steigt kontinuierlich an und

verdoppelte sich im letzten Jahrzehnt. (Lohse und Müller-Oerlinghausen, 1999). Doxepin und Trimipramin gehören zu den wichtigsten Vertretern der Antidepressiva mit sedierender Wirkung. Beide Substanzen werden seit mehr als 30 Jahren in der Therapie psychiatrischer Erkrankungen eingesetzt und sind in vielen Ländern verbreitet (Pinder et al., 1977; Lapierre et al., 1989). Im Jahr 1999 wurden allein in Deutschland etwa 51,5 Mio. definierte Tagesdosen von Doxepin verordnet, was ungefähr einem Siebtel aller Antidepressivaverschreibungen entspricht. Trimipramin rangiert mit etwa 22,6 Mio. definierten Tagesdosen auf Rang vier unter den meistverordneten sedierenden Antidepressiva (Lohse und Müller-Oerlinghausen, 1999). Aufgrund einer Erweiterung der Indikationsstellung scheint die Bedeutung dieser Medikamente in den kommenden Jahren tendenziell noch zuzunehmen (Lohse und Müller-Oerlinghausen, 1999; Berger und Gastpar, 1996). Trotz Weiterentwicklung der Medikamente weist die antidepressive Pharmakotherapie mit etwa 30 - 40 % eine hohe Quote von Therapieversagern auf (Möller, 1991; Nelson, 2003) und wird immer noch von häufigen und starken Nebenwirkungen begleitet (Rao et al., 1996).

1.1.2 Wirkungsweise und Indikation von trizyklischen Antidepressiva

Nach heutigem Erkenntnisstand wird angenommen, dass depressiven Erkrankungen ein Monoaminmangel zugrunde liegt, der zu einer gesteigerten Empfindlichkeit prä- und postsynaptischer Rezeptoren für die Monoamine Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) führt. Bei den Wirkmechanismen der Antidepressiva ist zwischen Akuteffekten und Langzeiteffekten zu unterscheiden. Akute Wirkungen entstehen direkt über die Bindung an Transportproteine bzw. die Blockade von Neurotransmitterrezeptoren und rufen damit erwünschte, oftmals jedoch unerwünschte Begleiterscheinungen hervor. Der langfristige Effekt, welcher nach ungefähr 2 - 3 Wochen einsetzt, beruht auf komplexen Veränderungen der Empfindlichkeit von prä- und postsynaptischen Rezeptoren und der Signaltransduktionsmechanismen. Aufgrund der Beobachtung, dass es zu klinischer Besserung der depressiven Symptomatik erst nach frühestens 14-tägiger Behandlungsdauer kommt, wird dieser langfristige Effekt für die eigentliche antidepressive Wirkung verantwortlich gemacht. Hierbei scheint besonders dem β -adrenergen, dem dopaminergen sowie dem serotonergen System eine wichtige Rolle zuzukommen (Benkert und Hippus, 2003).

Die Qualität und Quantität der Begleitscheinungen bzw. auch Nebenwirkungen sind für die Wahl des individuell geeigneten Antidepressivums für den behandelnden Arzt wichtig. Sie sind auch für die Tatsache verantwortlich, dass trizyklische Antidepressiva heutzutage nicht mehr nur bei depressiven Syndromen, sondern auch zunehmend bei anderen psychiatrischen Erkrankungen zum Einsatz kommen. Beispiele hierfür sind Angstsyndrome, Essstörungen, Schlafstörungen oder Schmerzsyndrome (Benkert und Hippius, 2003).

1.1.2.1 Wirkungsweise und Indikation von Doxepin

Doxepin wird als eine Mischung aus seinem Zis- und Trans-Isomer im Verhältnis 15:85 verabreicht, wobei die einzelnen Isomere unterschiedlich starke Effekte aufweisen (Pinder et al., 1977; Schaumann und Ribbentrop, 1965). Doxepin hemmt akut die Noradrenalin- und Serotoninrückaufnahme aus dem synaptischen Spalt durch Bindung an präsynaptische Transportproteine (Pinder et al., 1977). Es ist ein sehr starker Histamin-H₁-Rezeptorantagonist, worin die Hauptursache für seine starke sedierende und zentral dämpfende Wirkung gesehen wird. Des Weiteren besitzt es durch Blockade muskarinischer Azetylcholinrezeptoren starke zentrale wie auch periphere anticholinerge Eigenschaften, die für eine Vielzahl vegetativer Nebenwirkungen verantwortlich sind. Ausgeprägte α_1 -antagonistische sowie antiserotonerge Wirkungen werden mit dem sedierenden, blutdrucksenkenden aber auch appetitstimulierenden Effekt von Doxepin in Zusammenhang gebracht (Pinder et al., 1977; Richelson und Nelson, 1984). Eine analgetische Wirkung und die Suppression des REM-Schlafs lassen sich weiterhin beobachten (Pinder et al., 1977).

Die langfristige Gabe von Doxepin führt zu vielfältigen Adaptationsprozessen auf der Ebene der Neurotransmitter, deren genaue Mechanismen jedoch noch weitgehend unbekannt sind. Beispielsweise sind eine Verminderung der Zahl postsynaptischer β_1 -Rezeptoren („ β -Downregulation“) zu nennen, welche funktionell mit einer Sensitivitätsminderung gegenüber Noradrenalin einhergeht, sowie eine funktionell gesteigerte Empfindlichkeit postsynaptischer Serotoninrezeptoren (Benkert und Hippius, 2003).

Aufgrund seiner starken sedierenden Eigenschaften gilt Doxepin als Mittel der Wahl bei ängstlich-agitiert-depressiven Syndromen. Weitere Anwendungsgebiete sind Angstsyndrome, Schlafstörungen, leichte Entzugssyndrome bei Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenabhängigkeit sowie die Behandlung chronischer Schmerzzustände. Hinsichtlich der empfohlenen Tagesdosis und des therapeutischen Bereichs

herrschen kontroverse Meinungen. Ursache hierfür sind die in Kapitel 1.1.5 beschriebenen interindividuell großen Unterschiede der Plasmakonzentrationen bei gleichen Doxepindosen sowie die widersprüchlichen Daten zur Korrelation zwischen dem Medikamentenspiegel und dem pharmakologischen Effekt (Ereshefsky et al., 1988; Rao et al., 19996; Leucht et al., 2001). Aufgrund der Nebenwirkungen wird zu einem einschleichenden Therapiebeginn mit z.B. 3×25 mg/d geraten und kontinuierlicher Steigerung der Tagesdosis auf 150 mg/d in der ambulanten und bis zu 300 mg/d in der stationären Therapie (Benkert und Hippus, 2003; Pinder et al., 1977). Der empfohlene Plasmaspiegel wurde zuletzt mit 50 – 250 ng/ml angegeben (Leucht et al., 2001).

1.1.2.2 Wirkungsweise und Indikation von Trimipramin

Trimipramin wird als Razemat, das heißt als eine 50:50-Mischung seiner L- und R-Enantiomeren verabreicht, wobei L-Trimipramin eine größere pharmakologische Aktivität zuzukommen scheint (Gross et al., 1991). Trotz seiner Strukturanalogie zu Imipramin weist Trimipramin Eigenschaften auf, die teilweise gegensätzlich zu denen typischer Antidepressiva sind und ihm eine Sonderrolle verschaffen, weswegen es auch als atypisches Antidepressivum bezeichnet wird (Petersen und Richelson, 1982; Suckow und Cooper, 1984). Trimipramin beeinflusst kaum die Noradrenalin- und Serotoninrückaufnahme (Randrup und Bræstrup, 1977; Hauser et al., 1985), bewirkt keine β -Downregulation (Hauser et al., 1985; Lapierre et al., 1989) und keine Suppression des REM-Schlafs (Rüther, 1989; Mouret et al., 1989; Berger und Gastpar, 1996). Insbesondere letztere zwei Effekte galten lange Zeit als zwangsläufig verbunden mit der stimmungsaufhellenden Wirkung von Antidepressiva, was aber gerade durch die Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Trimipramin in Frage gestellt wurde (Hauser et al., 1985; Berger und Gastpar, 1996). Trimipramin besitzt eine relativ hohe Affinität zum dopaminergen D_2 -Rezeptor (Randrup und Bræstrup, 1977; Waldmeier, 1982; Richelson und Nelson, 1984), zum α_1 -Rezeptor (Richelson und Nelson, 1984) und zum serotonergen $5-HT_2$ -Rezeptor (Hohagen et al., 1994), womit es in seiner pharmakologischen Eigenschaft atypischen Neuroleptika ähnelt (Gross et al., 1991, Berger und Gastpar, 1996). Dies lässt einen antipsychotischen Effekt von Trimipramin erwarten, was durch eine klinische Studie sowie einzelne Erfolge bei der Therapie schizoaffektiver Störungen teilweise belegt wurde (Eikmeier et al., 1991; Wiegand und Berger, 1989). Aufgrund seiner besonderen Eigenschaften gilt Trimipramin nicht nur als potentes Therapeutikum, sondern auch als wichtiges Instru-

ment der Wissenschaft für das Verständnis der Depression (Berger und Gastpar, 1996). Es besitzt schlafinduzierende Wirkung, erhöht die Schlafeffizienz und die Schlafdauer (Mouret et al., 1989; Hohagen et al., 1994) und verstärkt im Gegensatz zu fast allen anderen Antidepressiva den REM-Schlaf.

Es verbessert sowohl objektiv als auch subjektiv die Schlafqualität (Pecknold und Luthe, 1989; Hohagen et al., 1994), was es zum Mittel der Wahl bei sekundären Schlafstörungen macht (Rüther, 1989; Pecknold und Luthe, 1989; Assalian et al., 1989; Berger und Gastpar, 1996). Weitere Hauptindikation stellt die Therapie von depressiven Symptomen mit Angstzuständen, Agitiertheit, Unruhe und Schlaflosigkeit dar.

1.1.3 Nebenwirkungen von Doxepin

Vegetative Begleiterscheinungen stellen einen Großteil der unerwünschten Nebenwirkungen von trizyklischen Antidepressiva dar. Ihre klinische Charakteristik hängt ab vom Zusammenspiel der vielfältigen zentralen und peripheren vegetativen Effekte und kann interindividuell sehr unterschiedlich und sogar entgegengesetzt imponieren. Häufig genannte Beschwerden von Patienten nach Doxepinmedikation sind Mundtrockenheit, Schwindel, Obstipation und Benommenheit (Pinder et al., 1977). Sie treten bevorzugt zu Behandlungsbeginn auf und bilden sich oft bei langfristiger Gabe zurück (Pinder et al., 1977). Bei Überdosierung können starke periphere und zentrale anticholinerge Effekte Komplikationen wie paralytischen Ileus, Harnsperre, Kollapszustände und delirante Syndrome zur Folge haben.

Kardiovaskuläre Begleiterscheinungen stellen eine weitere Ursache unerwünschter Nebenwirkungen von trizyklischen Antidepressiva dar. Insbesondere können Überleitungsverlängerungen bis hin zu Herzrhythmusstörungen beobachtet werden, weswegen vor Therapiebeginn ein EKG geschrieben werden muss, um vorher bestehende Überleitungsstörungen wie z.B. Schenkelblöcke auszuschließen. Bei einem Teil der Patienten kann eine orthostatische Hypotonie beobachtet werden, welche besonders bei älteren Patienten Stürze und Noncompliance zur Folge haben können (Gastpar et al., 1989). Seltener vorkommende Nebenwirkungen sind eine rigorartige Muskeltonuserhöhung, Gewichtszunahme sowie die sehr seltene Agranulozytose, die normalerweise durch Überdosierungen ausgelöst werden (Benkert und Hippus, 2003).

Generell scheint Doxepin weniger und schwächere Nebenwirkungen als vergleichbare trizyklische Antidepressiva hervorzurufen (Pinder et al., 1977). *In-vitro*-Studien

zeigten eine bis zu viermal schwächere Aktivität an muskarinischen Rezeptoren als das Strukturanalogon Amitriptylin (Richelson und Nelson, 1984). Insbesondere kardiovaskuläre Begleiterscheinungen sind ungewöhnlich, was es für ältere und kardial vorbelastete Patienten besonders geeignet erscheinen lässt (Pinder et al., 1977; Hrdina et al., 1990). Es konnte ein Zusammenhang zwischen Doxepinplasma-spiegel und Häufigkeit und Stärke von unerwünschten Nebenwirkungen nachgewiesen werden (Rao et al., 1996; Burke und Preskorn, 1999), woraus folgt, dass ein konstanter Medikamentenspiegel die Sicherheit des Patienten erhöht.

1.1.4 Nebenwirkungen von Trimipramin

Aufgrund seiner speziellen Eigenschaften, insbesondere dem geringen Einfluss auf das noradrenerge System, besitzt Trimipramin relativ wenig und schwache Nebenwirkungen (Assalian et al., 1989; Lapierre et al., 1989). Besonders kardiovaskuläre Begleiterscheinungen sind bei Trimipramin nur sehr schwach ausgeprägt (Lapierre et al., 1989). Die wichtigsten Nebenwirkungen werden hervorgerufen durch den sedierenden Effekt und die relativ starken anticholinergen Eigenschaften (Lapierre, 1989). Patienten klagen am häufigsten über Schläfrigkeit, Mundtrockenheit, verschwommenes Sehen, Schwindel und Obstipation (Lapierre et al., 1989; Assalian et al., 1989; Hohagen et al., 1994; Eap et al., 1992). Trimipramin scheint weniger epileptogen als viele andere Antidepressiva zu wirken (Gastpar, 89) und besaß in *In-vitro*-Studien sogar neuronal dämpfende Eigenschaften (Luchins et al., 1984). Trotzdem wurden klinisch Krampfanfälle beobachtet und auf diesbezügliche Vorerkrankungen ist beim Patienten zu achten (Settle und Ayd, 1980).

1.1.5 Pharmakokinetik von Doxepin

Aufgrund ihrer engen strukturellen Verwandtschaft besitzen trizyklische Antidepressiva viele pharmakokinetische Gemeinsamkeiten (Suckow und Cooper, 1984). Doxepin wird als gut fettlösliche Substanz schnell und fast vollständig aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Es weist jedoch mit lediglich 13 – 45 % die geringste Bioverfügbarkeit von allen trizyklischen Antidepressiva auf, da es in der Leber einem starken *First-pass*-Effekt mit hoher interindividueller Variabilität unterliegt (Pinder et al., 1977; Ereshefsky et al., 1988; Haritos et al., 2000). Die N-Demethylierung, die Ringhydroxylierung und die N-Oxidierung stellen die Hauptmetabolisierungswege von Doxepin dar (Pinder et al., 1977; Faulkner et al., 1983; Haritos et al., 2000). Der Großteil der Metaboliten wird glukuronidiert über die Niere ausgeschieden (Haritos et

al., 2000). Die Plasmahalbwertszeit von Doxepin wird mit 8,2 - 24,5 h, die seines aktiven Metaboliten mit 28,5 - 80,7 h angegeben (Fachinformation Aponal[®] 75/ Aponal[®] 100, 1999).

Durch N-Demethylierung entsteht aus dem tertiären Amin Doxepin das sekundäre Amin N-Desmethyldoxepin, welches teilweise stärkere pharmakologische Aktivität besitzt als die Muttersubstanz (Pinder et al., 1977). Es ist bekannt, dass die Summe der Plasmaspiegel von Doxepin und seinem demethylierten Metaboliten eine höhere Korrelation mit dem therapeutischen Effekt aufweist als der Plasmaspiegel von Doxepin allein (Faulkner et al., 1982; Midha et al., 1991). Ein weiterer Metabolisierungsweg stellt die Ringhydroxylierung von sowohl Doxepin als auch N-Desmethyldoxepin dar. Dieser Schritt wird stereoselektiv mit Präferenz des Trans-Isomers vollzogen. Dementsprechend wird eine Akkumulierung des Zis-Isomers sowie eine mehr als doppelt so hohe Halbwertszeit im Vergleich zum Trans-Isomer beobachtet (Haritos et al., 2000, siehe *Abbildung 2*). Weitere in niedrigen Konzentrationen nachgewiesene Metaboliten sind Doxepin-N-Oxid und Di-Desmethyldoxepin. Hauptmetaboliten im Urin sind glukuronidiertes E-2-Hydroxy-Doxepin und E-2-Hydroxy-N-Desmethyldoxepin (Haritos et al., 2000).

Mehrere genetisch polymorphe Cytochrom P-450-Enzyme sind am Metabolismus von trizyklischen Antidepressiva beteiligt, was ihre große interindividuelle pharmakokinetische Variabilität erklären könnte. Es wurde nachgewiesen, dass insbesondere CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 und CYP1A2 am Metabolismus der Strukturanaloga Amitriptylin, Nortriptylin, Clomipramin, Imipramin und Desipramin beteiligt sind (Mellström et al., 1986; Mellström et al., 1981; Kramer Nielsen et al., 1992; Madsen et al., 1995; Spina et al., 1997). Bei der Verstoffwechselung von Doxepin gilt das Enzym CYP2D6 als Schrittmacherenzym, das fast ausschließlich für die Ringhydroxylierung verantwortlich ist, während es bei der N-Demethylierung eine geringere Rolle spielt (Haritos et al., 2000). Diese wird vorrangig durch die Isoenzyme CYP1A2 und CYP3A4 katalysiert, wie *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien nachwiesen (Haritos et al., 2000; Ereshefsky et al., 1988). Die polymorphen Enzyme CYP2C9 und CYP2C19 scheinen in geringerem Maß auch an dieser Reaktion beteiligt zu sein (Härtter et al., 2002). *Abbildung 2* stellt einen Überblick über die Abbauege von Doxepin und die vermutlich daran beteiligten Enzyme dar, wie sie u.a. von *Haritos et al.* vorgeschlagen wurden.

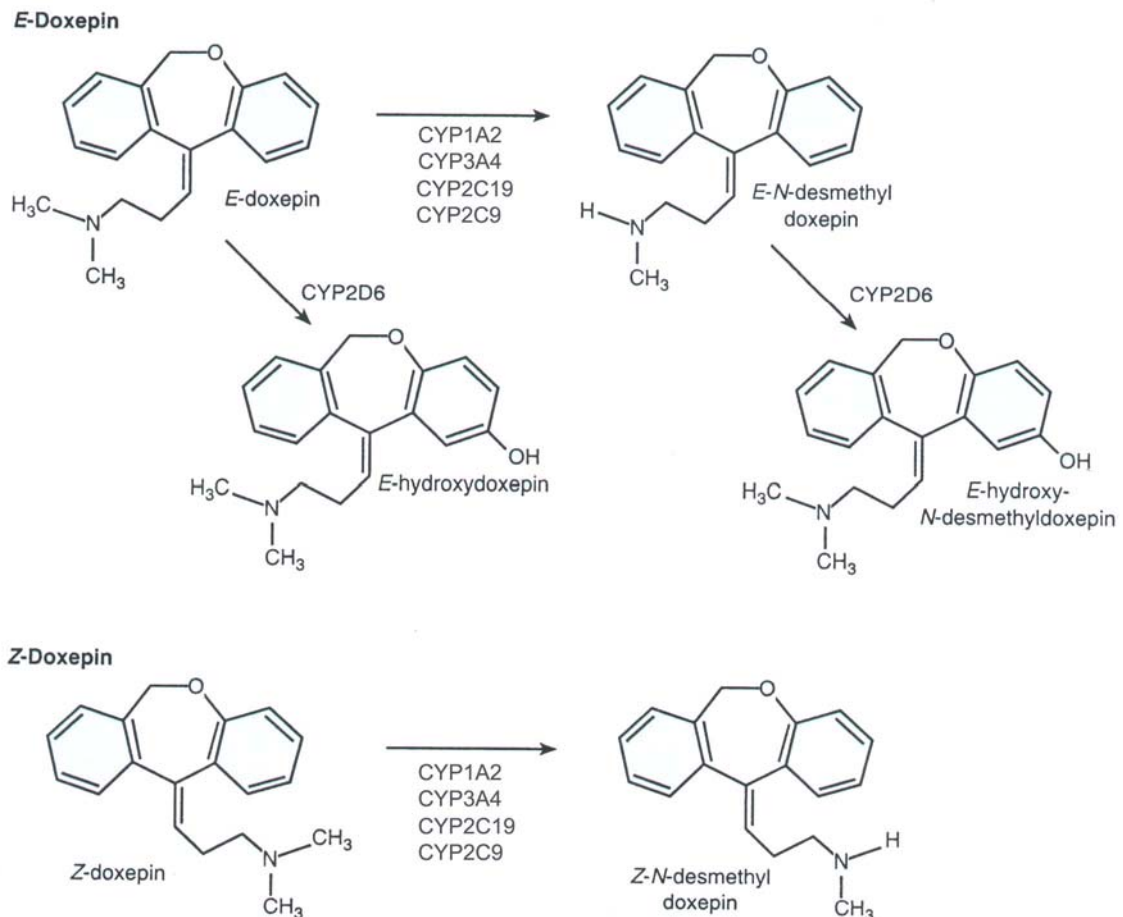


Abbildung 2: stereospezifische Abbauwege von Doxepin und beteiligte Enzyme (nach Haritos et al., 2000)

1.1.6 Pharmakokinetik von Trimipramin

Trimipramin wird nach oraler Applikation schnell aus dem Magen-Darm-Trakt aufgenommen und erreicht den Spitzenplasmaspiegel nach $3,1 \pm 0,6$ h (Abernethy et al., 1983). Die Bioverfügbarkeit fällt wie bei anderen trizyklischen Antidepressiva mit 17,8 - 62,7 % relativ gering aus und weist eine hohe Schwankungsbreite auf (Abernethy et al., 1983). Wichtigste Metabolisierungswege sind wie auch schon bei Doxepin die N-Demethylierung und die Ringhydroxylierung (Suckow und Cooper, 1984). Hauptmetaboliten sind N-Desmethyltrimipramin, 2-Hydroxy-Trimipramin und 2-Hydroxy-N-Desmethyltrimipramin (Suckow und Cooper, 1984). N-Oxidierung, Dealkylierung sowie eine zweite Demethylierung von N-Desmethyltrimipramin sind weitere Abbauwege, die jedoch eine geringere Rolle spielen (Suckow und Cooper, 1984). Die Elimination von Trimipramin erfolgt hauptsächlich glukuronidiert über die Niere (Suckow und Cooper, 1984). Die Plasmahalbwertszeit beträgt nach oraler Gabe $24 \pm 2,3$ h (Abernethy et al., 1983).

Das Wissen um die Abbauewege von Trimipramin ist noch lückenhaft. *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien belegen, dass die Ringhydroxylierung von Trimipramin hauptsächlich durch CYP2D6 katalysiert wird (Eap et al., 1992; Bolaji et al., 1993). Dieser Schritt scheint stereoselektiv mit Präferenz des L-Isomers zu sein (Eap et al., 2000). Bei der N-Demethylierung spielt CYP2D6 vermutlich eine untergeordnete Rolle. Lediglich zwei Studien in den letzten Jahren konnten eine mögliche Beteiligung von CYP2C19, CYP3A4 sowie CYP1A2 an der Demethylierung von Trimipramin nachweisen (Eap et al., 2000; Seifritz et al., 1994). Über das Enzym CYP2C9, das bei der N-Demethylierung anderer trizyklischer Antidepressiva eine wichtige Rolle spielt, gibt es bisher keine Studien (Kirchheiner et al., 2001). Einen Überblick über die Hauptabbauewege und die vermutlich beteiligten Enzyme gibt *Abbildung 3*.

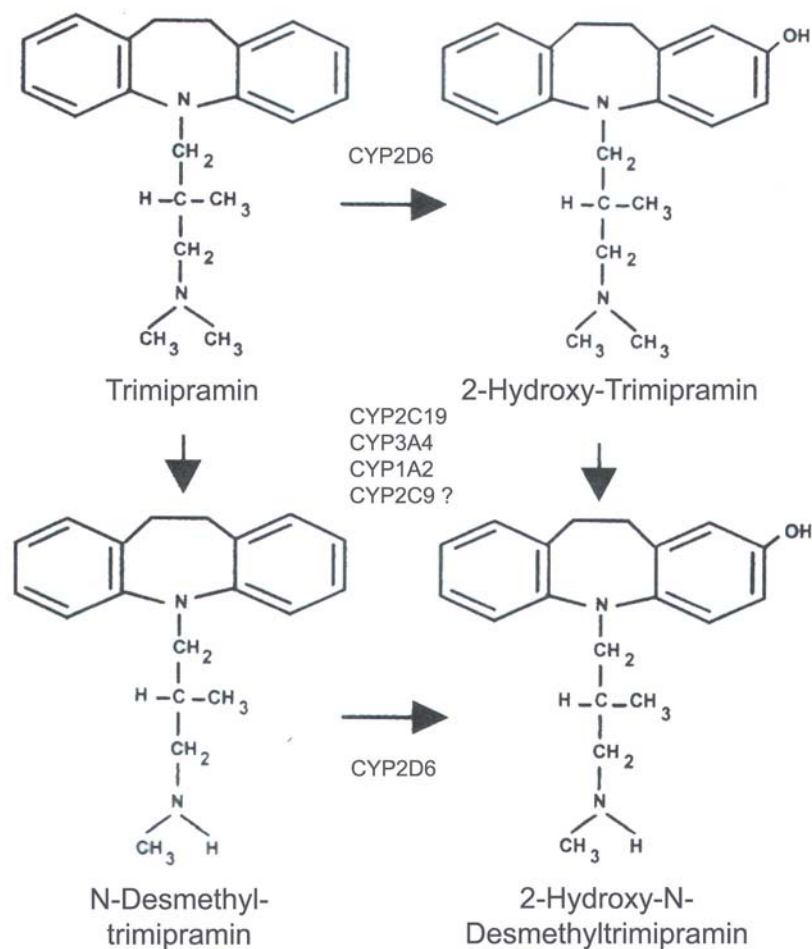


Abbildung 3: Abbauewege von Trimipramin und beteiligte Enzyme (nach Eap et al., 2000)

1.2 Das Cytochrom P-450-Enzymsystem

Das Cytochrom-P450-Enzymsystem spielt im menschlichen Körper eine herausragende Rolle als Teil der Biotransformation. Hierunter versteht man die Aktivierung

und Deaktivierung von Fremdstoffen und endogenen Substanzen. Die Cytochrom P-450-Enzyme („CYPs“) werden für den Metabolismus von etwa 50 % der Medikamente verantwortlich gemacht (Bertz und Grannemann, 1997), womit sie einen Hauptanteil an der Entgiftung des Körpers tragen und einen bedeutenden Einfluss auf das Ausmaß und die Dauer von Medikamentenwirkungen besitzen. Ihre Beteiligung an der Umwandlung von inaktiven zu aktiven Substanzen wird bei der Entwicklung von Medikamenten – so genannten „Prodrugs“ - gezielt genutzt, aber auch im Zusammenhang mit der Pathogenese von Krankheiten diskutiert (Shimada et al., 1994). Viele Cytochrom P-450-Enzyme scheinen auch an der Synthese und am Abbau von endogenen Substraten, wie z.B. Hormonen, beteiligt zu sein (Brockmöller et al., 2000).

Die Cytochrom P-450-Enzyme bilden eine Superfamilie von Isoenzymen, deren Anzahl beim Menschen auf 60 - 200 geschätzt wird (Gonzalez und Nebert, 1990). Namensgebend ist ein im C-terminalen Bereich gebundener Porphyrin-Häm-Komplex, welcher in reduzierter Form Kohlenmonoxid binden kann und dann in der spektrofotometrischen Untersuchung eine charakteristische Absorptionslinie bei 450 nm zeigt. Die Hämgruppe ist von Proteinstrukturen umgeben, worauf die Substratspezifität der Isoenzyme beruht (Bertz und Grannemann, 1997). Die einzelnen Genfamilien werden nach dem Ausmaß ihrer Sequenzhomologie benannt. Beträgt die Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen über 40 %, gehören die Proteine zur selben Familie. Sequenzen, die zu über 55 % identisch sind, werden einer gemeinsamen Subfamilie zugeordnet (Nebert, 1987). Die Zugehörigkeit eines Cytochrom-Enzyms zu einer Familie und Subfamilie lässt sich durch eine spezielle Nomenklatur ablesen. So steht beispielsweise beim Enzym CYP2C9 die Ziffer 2 für die Familie, das C für die Subfamilie und die 9 für das spezifische Enzym. Beim Menschen sind 17 Familien und 42 Subfamilien bekannt (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Cytochrom P-450-Enzyme kommen grundsätzlich ubiquitär im menschlichen Körper vor, wobei der Großteil in der Leber lokalisiert ist (Bertilsson et al., 1997). Obwohl sich die Isoenzyme intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum befinden, werden sie als „mikrosomale Enzyme“ bezeichnet, da sie bei der fraktionierten Zentrifugierung mit den Bruchstücken der Zellmembran, den Mikrosomen, sedimentieren.

Die katalytische Aktivität der Cytochrom P-450-Enzyme ist nicht konstant, sondern weist große intra- und interindividuelle Unterschiede auf. Interindividuelle Unter-

de werden häufig durch genetische Polymorphismen einzelner Isoenzyme verursacht. Gene mit geringer Abweichung in ihrer DNA-Sequenz (Allele) werden als "polymorphe" Gene bezeichnet. Als relevant für pharmakogenetische Überlegungen gilt ein polymorphes Gen, wenn es mit einer Frequenz von $> 1\%$ in einer Population existiert und mindestens ein Polymorphismus die Aktivität des betroffenen Enzyms verändert. Hierbei zu beachten ist, dass teilweise große Unterschiede zwischen ethnischen Populationen wie etwa Kaukasier und Asiaten bezüglich der Allelfrequenzen herrschen (Shimada et al., 1994). Genetische Polymorphismen bzw. die resultierenden Allele codieren eventuell für Enzyme mit unterschiedlicher Aktivität. Dies kann eine reduzierte oder fehlende, aber auch eine verstärkte Metabolisierung von Arznei- und anderen Fremdstoffen zur Folge haben. Bei verminderter Enzymleistung kann die mangelnde Bioaktivierung von Prodrugs den Therapieerfolg in Frage stellen, während der verlangsamte Abbau eines Medikaments verstärkt Nebenwirkungen zur Folge haben kann. Das genaue Wissen um die Enzyme und deren Beteiligung am Medikamentenabbau kann somit deren Effizienz und Sicherheit deutlich verbessern.

1.3 Das Enzym Cytochrom P-450-2D6

1.3.1 Das Cytochrom P-450-2D6 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel

Das Enzym Cytochrom P-450-2D6 ist das einzige funktionale Enzym aus der 2D-Familie (Kimura et al., 1989). Das Hämprotein besteht aus 497 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von $\sim 55,8$ kDa und wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, aber auch in anderen Geweben wie Magen-Darm-Trakt, Niere oder Gehirn. Obwohl es am Cytochrom P-450-Gesamtgehalt der Leber nur einen Anteil von ungefähr 2% besitzt (Shimada et al., 1994), werden etwa 25% aller Medikamente von CYP2D6 metabolisiert (Bertz und Grannemann, 1997).

Typische Substrate von CYP2D6 sind schwache Basen, deren kationischer Bereich, häufig basischer Stickstoff, $5 - 7 \text{ \AA}$ entfernt liegt vom zu oxidierenden Kohlenstoffatom (Koymans et al., 1993; de Groot et al., 1997). Diese Eigenschaft weisen viele Substanzen auf, die an adrenergen, dopaminergen oder serotonergen Rezeptoren oder Transportern binden (Brockmöller et al., 2000), weswegen besonders kardiovaskulär wirkende und psychotrope Medikamente eine hohe Affinität zu CYP2D6 besitzen (Daly et al., 1996). In den letzten Jahren wurden auch endogene

Substrate des CYP2D6 entdeckt, wie z.B. Tryptamin (Martinez et al., 1997) und Thyramin, das von CYP2D6 zu Dopamin hydroxyliert wird (Hiroi et al., 1998). Dieses Isoenzym wird im Zusammenhang mit der Pathogenese verschiedener neoplastischer und neurologischer Erkrankungen wie Lungenkrebs oder Parkinson-Erkrankung diskutiert, seit bekannt ist, dass auch neurotoxische Umweltgifte und Prokarzinogene zu seinen Substraten zählen (Gilham et al., 1997; Landi et al., 1996; Coutts und Urichuk, 1999; Rannug et al., 1995; Nebert, 1997). Eine Übersicht über die Substrate von CYP2D6 gibt *Tabelle 1*.

Tabelle 1: Nach Substanzklassen geordnete Substrate von CYP2D6 (nach Brockmüller et al., 2000; <http://medicine.iupui.edu.flockhart/>)

Substanzklasse	Vertreter
Antidepressiva	Amitriptylin, Clomipramin, Desipramin, Imipramin, Nortriptylin, Paroxetin, Fluoxetin, Fluvoxamin, Venlafaxin, Minaprin
Neuroleptika	Haloperidol, Perphenazin, Thioridazin, Chlorpromazin
Beta-Adrenozeptorenblocker	Carvedilol, Metoprolol, Propafenon Timolol, Propranolol, Alprenolol
Psycho-Stimulans	Amphetamin, Dexfenfluramin, Dextrometorphan
Opiat	Codein, Tramadol
Antiarrhythmikum, Na ⁺ -Blocker	Flecainid, Encainid, Lidocain, Mexiletin, Timolol, Perhexilin
Dopamin-Antagonisten	Metoclopramid
Serotonin-Antagonisten	Ondansetron
Orale Antidiabetika/Biguanide	Phenformin
Antiöstrogene	Tamoxifen
Antihypertensiva	Debrisoquin
Exogene Toxine	MPTP, N-Nitrosonornicotin
Endogene Neurotransmitter	Tyramin, Tryptamin

CYP2D6 hydroxyliert klinisch signifikant die wichtigsten trizyklischen Antidepressiva wie Amitriptylin, Desipramin, Imipramin und Clomipramin (Baumann et al., 1986; Spina et al., 1997; Madsen, 1995; Kramer Nielsen et al., 1992). Der Einfluss dieses

polymorphen Enzyms auf den Metabolismus von Trimipramin und Doxepin ist jedoch erst teilweise geklärt. CYP2D6 scheint die Hydroxylierung von Trimipramin und Doxepin stereospezifisch zu katalysieren, aber nicht deren Demethylierung (Bolaji et al., 1993; Haritos et al., 2000). Es gibt bisher keine Daten über den quantitativen Anteil des Proteins an der Verstoffwechselung dieser Medikamente sowie die Abhängigkeit pharmakokinetischer Daten, wie beispielsweise *First-pass*-Effekt und systemische Clearance von dessen Polymorphismus.

1.3.2 Genetische Polymorphismen von Cytochrom P-450-2D6

Das CYP2D6-Gen bildet mit den zwei Pseudogenen *CYP2D7* und *CYP2D8* einen Komplex auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (Genlocus 22q13.1). Es setzt sich aus 4378 Basenpaaren und 9 Exons zusammen (Kimura et al., 1989). Neben dem Wildtyp-Allel *1A sind mittlerweile mehr als 80 Allelvarianten bekannt, was den polymorphen Charakter dieses Enzyms unterstreicht (Daly et al., 1996; <http://dr.nelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Abhängig von der jeweiligen Mutation kodieren die Allele für Enzyme mit normaler, erniedrigter oder gar keiner Aktivität. Einen Sonderstatus besitzt das Allel *2xN, was durch Duplikation eine erhöhte Enzymleistung besitzt (Daly et al., 1996). Die bei der autosomalen Vererbung entstandene Kombination eines väterlichen und eines mütterlichen Allels determiniert den CYP2D6-Phänotyp, so dass die Anzahl funktionaler Allele mit der Metabolisierungsaktivität korreliert. Träger von 0, 1, 2 oder ≥ 3 aktiven Allelen können somit in PMs (*poor metabolizer*), IMs (*intermediate metabolizer*), EMs (*extensive metabolizer*) und UMs (*ultrarapid metabolizer*) eingeteilt werden (Brockmöller et al., 2000).

Die Prävalenz der einzelnen Allele in einer Population weist eine hohe Variabilität zwischen Bevölkerungsgruppen auf. Bei Kaukasiern sind die häufigsten Allelvarianten *1 (36 %), *2 (32 %), *4 (20 %), *3 (2 %), *5 (2 %), *9 (2 %) und *6 (1 %), wohingegen die Allelfrequenz von *10 bei Ostasiaten etwa 50 % und von *17 bei Afrikanern etwa 34 % beträgt (Sachse et al., 1997; Ingelman-Sundberg et al., 1999; Bradford, 2002). In einer kaukasischen Population beträgt der Anteil von EMs ca. 50 %, von IMs ca. 40 %, von PMs 5 - 10 % und von UMs 1 - 2 % (Sachse et al., 1997). Auch hier imponiert eine große Heterogenität zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen, wie ein Anteil von lediglich 1 % PMs in China oder 29 % UMs in Äthiopien verdeutlicht (Bertilsson et al., 1992; Aklillu et al., 1996).

Der CYP2D6-Polymorphismus besitzt einen signifikanten Effekt auf die Pharmakokinetik der meisten trizyklischen Antidepressiva (Kirchheiner et al., 2001). In zahlreichen Studien wiesen CYP2D6-PMs um mehr als 50 % reduzierte orale Clearances sowie bis zu zehnfach höhere Plasmaspiegel für die entsprechenden Psychopharmaka auf als CYP2D6-EMs (Kirchheiner et al., 2003; Bertz und Grannemann, 1997). Folglich sind Langsammetabolisierer dieses Isoenzym vermindert gefährdet, bei der Einnahme von Substanzen mit einer geringen therapeutischen Breite, wie sie trizyklische Antidepressiva darstellen, unerwünschte Nebenwirkungen zu erleiden. In der Tat wurde von einem erhöhten Risiko für medikamenteninduzierte Anfälle bei der Gabe von Antidepressiva im Zusammenhang mit der CYP2D6-Aktivität berichtet (Kirchheiner et al., 2004).

Das Ziel zahlreicher pharmakogenetischer Arbeiten heutzutage ist die Erforschung des Einflusses des CYP2D6-Polymorphismus auf die antidepressive Pharmakotherapie, um dem Kliniker praktische Hilfestellung bei konkreten Therapieentscheidungen zu geben. Neben der Entwicklung preisgünstiger und zeitnaher Methoden zur Genotypisierung des Patienten, wie z.B. Bedside-Genotypisierungs-Chips, steht die Erforschung des Einflusses des CYP2D6-Genotyps auf die Pharmakokinetik und -dynamik von Antidepressiva im Vordergrund. So kann man mithilfe der Ergebnisse klinischer pharmakokinetischer Studien der letzten Jahre Dosisanpassungen für eine Anzahl trizyklischer Antidepressiva berechnen, die in Abhängigkeit vom CYP2D6-Genotyp prozentuale Angaben der Normaldosis geben. Hierbei werden die Genotypbedingten Unterschiede in der Clearance der Substanzen ausgeglichen (Bioäquivalenzprinzip), um einen möglichst konstanten interindividuellen Medikamentenplasmaspiegel zu erreichen (Kirchheiner et al., 2001, Kirchheiner et al., 2003, siehe *Abbildung 4*). Ähnliche Dosisempfehlungen für Doxepin und Trimipramin fehlen, da für diese zwei Medikamente bislang keine entsprechenden Daten vorliegen.

Es ist bekannt, dass der CYP2D6-Polymorphismus nicht nur Auswirkungen auf metabolisierende Enzyme von Antidepressiva, sondern auch auf Neurotransmitterrezeptoren und -transporter sowie weitere Zielmoleküle im Gehirn besitzt (Kirchheiner et al., 2004). Diese Mechanismen scheinen wesentlich komplexer zu sein und ihre Erforschung befindet sich erst am Anfang. Ihr genaues Verständnis ist eine Voraussetzung, um die individuelle Reaktion eines Patienten bei Gabe eines Antidepressivums verlässlich vorherzusagen. Insofern sind Studien über den Einfluss des CYP2D6-Genotyps auf die Pharmakokinetik eines Medikaments als eine Annähe-

zung zu einer individualisierten Pharmakotherapie zu sehen, denen in den nächsten Jahren jedoch weitere Arbeiten zur Validierung der gewonnenen Ergebnisse folgen müssen.

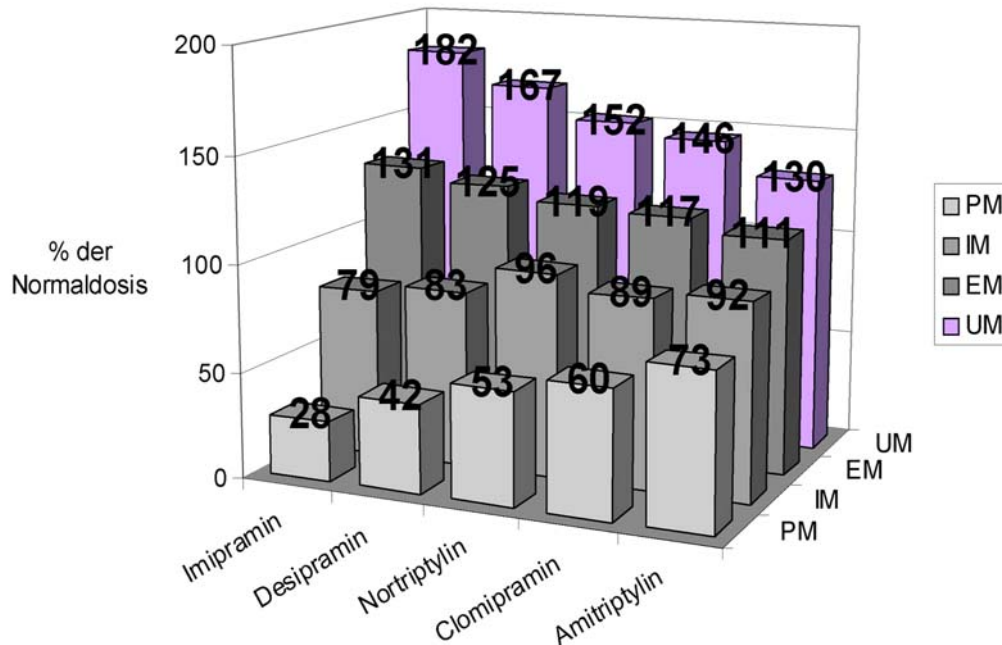


Abbildung 4: Dosisanpassungen von trizyklischen Antidepressiva in Abhängigkeit vom CYP2D6-Genotyp. Die Empfehlungen werden als Prozentwert der vom Hersteller empfohlenen Dosis angegeben (nach Kirchheiner et al., 2004).

1.4 Das Enzym Cytochrom P-450-2C9

1.4.1 Das Cytochrom P-450-2C9 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel

Das Cytochrom P-450-2C9 gehört zur Subfamilie 2C, welche aus vier Isoenzymen besteht. Bei den weiteren Mitgliedern handelt es sich namentlich um CYP2C8, CYP2C18 und CYP2C19 (Goldstein und de Morais, 1994). Die Subfamilie 2C macht beim Menschen etwa 20 % des Gesamtgehalts der Leber an Cytochrom P-450-Enzymen aus (Shimada et al., 1994) und trägt zu etwas 18 % zu dem von Cytochrom P-450-Enzymen katalysierten Medikamentenstoffwechsel bei (Wolf und Smith, 1999). Die Gene der vier Isoenzyme gruppieren sich auf dem Chromosom 10 in der Region 10q24.2 (Meehan et al., 1988) und liegen in der Reihenfolge Zentromer-RBP4 (Serum-Retinol-bindendes-Protein-Gen)-2C18-2C19-2C9-2C8-Telomer vor (Gray et al., 1995). Obwohl die einzelnen Isoenzyme mit mehr als 82 % eine hohe

Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (Goldstein und de Morais, 1994), gibt es nur wenige Überschneidungen in ihrer Substratspezifität (Wrighton und Stevens, 1992). Das CYP2C9 ist ein primär in der Leber lokalisiertes Enzym und stellt hier mit etwa 60 % den Großteil der Isoenzyme der CYP2C-Familie (Goldstein und de Morais, 1994). In etwa 200-fach geringerer Menge konnte es bisher nur noch im Intestinum gefunden werden (de Waziers et al., 1990). Das aus insgesamt neun Exons sich zusammensetzende Gen kodiert für ein Hämprotein von 490 Aminosäuren und einer Masse von ~ 52 kDa (Goldstein et al., 1994).

CYP2C9 metabolisiert eine Anzahl klinisch relevanter Medikamente. Eine Auswahl der zahlreichen Substrate, die in den letzten Jahren identifiziert wurden, bietet *Tabelle 2*. Es gibt Anzeichen, dass CYP2C9 die Metabolisierung von Antidepressiva katalysiert. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass CYP2C9 an der N-Demethylierung des trizyklischen Antidepressivums Amitriptylin sowie des SSRI Fluoxetin signifikant beteiligt ist (Ghahramani et al., 1997, von Moltke et al., 1997; Venkatakrishnan et al., 1998). Eine neuere Studie ergab Hinweise, dass CYP2C9 die N-Demethylierung von Doxepin katalysiert (Härtter et al., 2002). Über den Zusammenhang von CYP2C9 und trizyklischen Antidepressiva existieren bislang nur wenige *In-vitro*-Arbeiten und keine klinischen Studien (Kirchheiner et al., 2001).

Tabelle 2: nach Substanzklassen geordnete Substrate von CYP2C9 (nach Brockmüller et al., 2000; <http://medicine.iupui.edu/flockhart/>).

Substanzklasse	Vertreter
Nichtsteroidale Antiphlogistika	Diclofenac, Ibuprofen, Meloxicam, Piroxicam, Indometacin, S-Naproxen
Cumarine	S-Warfarin
Antiepileptika	Phenytoin
Antidepressiva	Amitriptylin, Fluoxetin
Orale Antidiabetika/ Insulinsensitizer	Tolbutamid, Glipizid, Rosiglitazon
Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten	Losartan, Irbesartan
HMG-CoA-Reduktasehemmer	Fluvastatin
Schleifendiuretika	Torasemid
Antiöstrogene	Tamoxifen

Bis auf wenige Ausnahmen ähneln sich die meisten Substrate strukturell. Es handelt sich in der Regel um schwache Säuren mit einem pKa-Wert zwischen 3,8-8,1, bei denen der anionische Bereich ~ 7 Å entfernt liegt von dem Kohlenstoffatom, das

in der Phase-I-Reaktion oxidiert wird. Interaktionen zwischen der elektronegativeren Gruppe des Substrats und der elektropositiveren Gruppe des Enzyms scheinen in hohem Maße die Affinität des Substrats zu beeinflussen, von CYP2C9 metabolisiert zu werden (Mancy et al., 1995; BC Jones et al., 1996; HP Jones et al., 1996). Zur Erkennung der unterschiedlichen zu verstoffwechselnden Substrate dienen dem Isoenzym CYP2C9 insgesamt sechs Substraterkennungsstellen (SRS, Substrate recognition sites), die durchschnittlich eine Größe von lediglich zwölf Aminosäuren besitzen (Gotoh et al., 1992).

1.4.2 Genetische Polymorphismen von Cytochrom P450-2C9

Bereits 1964 wurde im Zusammenhang mit familiär auftretenden starken Nebenwirkungen bei der Einnahme von Phenytoin eine erblich bedingte insuffiziente Hydroxylierung dieses Antiepileptikum diskutiert (Kutt et al., 1964). Eine pharmakogenetische Studie zur Metabolisierung des Sulfonylharnstoffs Tolbutamid bei insgesamt 50 Patienten und Probanden ergab einen bis zu 9-fachen Unterschied in der Tolbutamid-Clearance und eine trimodale Verteilung der Tolbutamideliminierungsraten. Die Autoren stellten für die Probanden mit verringerter Clearance eine defiziente Hydroxylierung von Tolbutamid fest und vermuteten, dass ein genetischer Polymorphismus des verstoffwechselnden Enzyms ihren Beobachtungen zugrunde liegen könne (Scott und Poffenbarger, 1979).

In der Folge konnte nachgewiesen werden, dass die Hydroxylierung von Phenytoin und Tolbutamid durch das gleiche Enzym katalysiert wird und es sich hierbei um CYP2C9 handelt (Relling et al., 1990). Neben dem Wildtyp wurden noch mindestens 5 funktionell unterschiedlich wirksame Allelvarianten dieses Enzyms entdeckt (Lee et al., 2002, <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c9.htm>). Während zahlreiche *In-vitro*- und *In-vivo*-Arbeiten über den Einfluss der Allele *2 und *3 auf die Pharmakokinetik von Medikamenten veröffentlicht wurden, existieren über die Allele *4, *5 und *6 nur spärliche *In-vitro*- bzw. Einzelfall-Studien (Lee et al., 2002; Ieiri et al., 2000; Dickmann et al., 2001; Kidd et al., 2002). Die Prävalenz der einzelnen CYP2C9-Allele unterliegt erheblicher interethnischer Varianz. Während die Allele *2 und *3 bei Afrikanern und Ostasiaten praktisch nicht vorkommen, wurden die Allele *4, *5 und *6 bisher noch nicht bei Kaukasiern gefunden und somit bei der vorliegenden Arbeit vernachlässigt. Einen Überblick über die prozentuale Verteilung der auf den Allelen

*1, *2 und *3 basierenden CYP2C9-Polymorphismen in verschiedenen ethnischen Bevölkerungen gibt *Tabelle 3*.

Tabelle 3: Prozentuale Anteile des CYP2C9-Genotyps in einzelnen ethnischen Populationen (nach Lee et al., 2002)

Allele von CYP2C9	Anteil bei Kaukasiern	Anteil bei Afrikanern	Anteil bei Asiaten
CYP2C9*1/*1	65 % (49 – 70 %)	87 – 97 %	92 – 98 %
CYP2C9*1/*2	20 % (16 – 34 %)	2 – 9 %	0 %
CYP2C9*1/*3	12 % (10 – 16 %)	1 – 4 %	2 – 8 %
CYP2C9*2/*2	0,9 % (0 – 6 %)	0 %	0 %
CYP2C9*2/*3	1,4 % (1 – 2 %)	0 %	0 %
CYP2C9*3/*3	0,4 % (0 – 1 %)	0 %	0 %

Die Allele *2 und *3 entstehen durch einzelne Punktmutationen der chromosomalen DNA (single nucleotide polymorphisms, SNPs), welche den Austausch von jeweils einer Aminosäure an Position 144 bzw. 359 der Aminosäurekette zur Folge haben. Der Wildtyp CYP2C9*1 besitzt in der Position 144 seiner Aminosäurenkette die Aminosäure Arginin, an Position 359 die Aminosäure Isoleucin (Arg¹⁴⁴/Ile³⁵⁹). Bei CYP2C9*2 ist das Arginin durch Cytosin ersetzt (CYP2C9*2Cys¹⁴⁴/Ile³⁵⁹), bei CYP2C9*3 das Isoleucin durch Leucin (CYP2C9*3Arg¹⁴⁴/Leu³⁵⁹).

Die einzelnen Allelvarianten weisen unterschiedliche Enzymaktivitäten auf. Zahlreiche Arbeiten belegen, dass sowohl *2 als auch *3 die Clearances zahlreicher klinisch relevanter Medikamente (siehe *Tabelle 2*) *in vitro* signifikant senken und Nebenwirkungen bei Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite vermehrt eine Senkung der Dosis *in vivo* erforderlich machen (Lee et al., 2002; Goldstein, 2001; Takashi et al., 2000). Das Ausmaß der Aktivitätsänderung der CYP2C9-Mutationen ist unklarer als im Falle von CYP2D6, da einerseits die Enzyme weiterhin eine Restaktivität besitzen und andererseits diese in hohem Maße substratspezifisch und somit nicht für alle Medikamente verallgemeinerbar ist. *In-vitro*-Studien ergaben Clearance-Verminderungen von 8 – 94 % bei *2 und von 71 – 97 % bei *3 (Lee et al., 2002). Klinische Studien zeigten jedoch, dass der Genotyp *3/*3 die geringste metabolische Aktivität aufweist, weswegen wir ihn in der vorliegenden Arbeit dem Phänotyp des CYP2C9-Langsammetabolisierers zugrunde legten. Das Ziel dieser klinischen Studie ist es, herauszufinden, ob der CYP2C9-Polymorphismus sich signifikant auf den Metabolismus von Trimipramin und Doxepin auswirkt, diesen Einfluss zu quantifizieren und gegebenenfalls eine Dosisanpassung in dessen Abhängigkeit zu berechnen.

1.5 Das Enzym Cytochrom P-450-2C19

1.5.1 Das Cytochrom P-450-2C19 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel

Das Cytochrom P-450-2C19 gehört wie das vorher betrachtete CYP2C9 zur Subfamilie 2C und ist somit vorrangig in der Leber lokalisiert (Goldstein und de Morais, 1994). Ebenso wie das CYP2C9-Gen setzt sich das CYP2C19-Gen aus neun Exons zusammen und kodiert für ein Hämprotein von 490 Aminosäuren, welches mit ~ 48 kDa geringfügig leichter ist (Goldstein und de Morais, 1994). Trotz einer Homologie in der Proteinstruktur von 96 % mit CYP2C9 (Goldstein und de Morais, 1994) besitzen die Isoenzyme nur geringe Überschneidungen hinsichtlich der Substratspezifität (Wrighton und Stevens, 1992). Obwohl es mit einem Anteil von lediglich 1 % an der Gesamtmenge an CYP2C-Enzymen in der Leber die geringste Konzentration der vier Isoenzyme aufweist (Goldstein und de Morais, 1994), ist CYP2C19 an der Metabolisierung einer Vielzahl klinisch wichtiger Medikamente beteiligt. Einen Überblick über einige der bisher bekannten Substrate bietet *Tabelle 4*.

Tabelle 4: nach Substanzklassen geordnete Substrate von CYP2C19 (nach Brockmöller et al., 2000; <http://medicine.iupui.edu/flockhart/>)

Substanzklasse	Vertreter
Protonenpumpenhemmer	Omeprazol, Lansoprazol, Pantoprazol
Antikonvulsiva/Sedativa	S-Mephenytoin, Diazepam, Primidon, Flunitrazepam, Phenobarbital
Antidepressiva	Amitriptylin, Imipramin, Clomipramin, Citalopram, Sertralin, Moclobemid
Zytostatika	Cyclophosphamid
Nichtsteroidale Antiphlogistika	Indometacin
Protease-Inhibitoren	Nelfinavir
Antimalariamittel	Proguanil
Beta-Blocker	Propranolol

Schon vor etwa zwanzig Jahren wurde bei einer klinischen pharmakogenetischen Studie eine Beteiligung von CYP2C19 an der Verstoffwechselung von Amitriptylin beobachtet (Baumann, et al., 1986). In den folgenden Jahren erbrachten weitere *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien den Nachweis, dass CYP2C19 signifikant die Seitenketten-N-Demethylierung weiterer trizyklischer Antidepressiva wie Clomipramin und Imipra-

min katalysiert (Venkatakrishnan et al., 1998; Nielsen et al., 1992; Skjelbo et al., 1993; Koyama et al., 1996; Madsen et al., 1997; Härtter et al., 2002). Daten zum Einfluss von CYP2C19 auf die Metabolisierung von Trimipramin und Doxepin sind spärlich. Zwei unlängst erschienene Studien wiesen jedoch nach, dass CYP2C19 auch an der N-Demethylierung von Trimipramin und Doxepin beteiligt ist (Eap et al., 2000, Härtter et al., 2002), was aufgrund der Strukturanalogie von trizyklischen Antidepressiva plausibel erscheint.

1.5.2 Genetische Polymorphismen von Cytochrom P450-2C19

1984 konnte durch klinische Studien demonstriert werden, dass die Hydroxylierung des Antikonvulsivum Mephenytoin einem autosomal rezessiv vererbten genetischen Polymorphismus unterliegt, welcher bei etwa 5 % der untersuchten Probanden eine defekte S-Mephenytoin 4'-Hydroxylase zur Folge hatte (Küpfer und Preisig, 1984). Etwa zehn Jahre später wurde nachgewiesen, dass es sich bei diesem Enzym um CYP2C19 handelt (Wrighton et al., 1993). Primär zwei Allelvarianten, CYP2C19*2 und CYP2C19*3, sind für den genetischen Defekt verantwortlich (Goldstein und de Morais, 1994). CYP2C19*2 liegt eine Punktmutation (G→A) des Basenpaares 681 in Exon 5 zugrunde, welche ein frühzeitiges Stop-Codon zur Folge hat. Hieraus resultiert ein verkürztes Protein mit einer Größe von lediglich 234 Aminosäuren, das über keine Häm-Bindungsstelle verfügt und somit inaktiv ist (Goldstein und de Morais, 1994). Ein ähnlicher Mechanismus ist für das CYP2C19*3 verantwortlich. Aufgrund einer Punktmutation des Basenpaares 636 (G→A) entsteht ein inaktives Protein aus 211 Aminosäuren (Goldstein und de Morais, 1994). Weitere seltenere Allelvarianten, wie CYP2C19*4 (Ferguson et al., 1998) und CYP2C19*5 (Ibeanu et al., 1998) wurden in den letzten Jahren entdeckt.

In Abhängigkeit von 0, 1 oder 2 aktiven Wildtypallelen wird der Phänotyp eines Individuums entsprechend als CYP2C19-Langsam-, Intermediär- oder Schnellmetabolisierer definiert (Brockmüller et al., 2000). Der genetische Polymorphismus von CYP2C19 weist eine hohe interethnische Heterogenität auf. Während 13 – 25 % der Ostasiaten zur Gruppe der PMs gehören, sind nur 2 – 5 % der Kaukasier Langsammetabolisierer und etwa 20 % Intermediärmetabolisierer. Die zwei defekten Allele *2 und *3 sind für mehr als 99 % der PMs bei Ostasiaten verantwortlich, aber nur für 87 % der Kaukasier (Ferguson et al., 1998). Weitere defekte Allele wurden in den letzten Jahren nur bei Kaukasiern entdeckt wie beispielsweise *4, das bei ungefähr

3 % der kaukasischen PMs gefunden wurde (Ibeanu et al., 1998). Aufgrund ihres seltenen Vorkommens besitzen sie jedoch vernachlässigbare klinische Relevanz. Da bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit eine Probandengruppe aus einer rein kaukasischen Population rekrutiert wurde, beschränkte sich die Genotypisierung auf die Detektion der Allele CYP2C19*1 und *2, sollte jedoch bei Einschluss von Asiaten auf CYP2C19*3 ausgeweitet werden (Brockmöller et al., 2000).

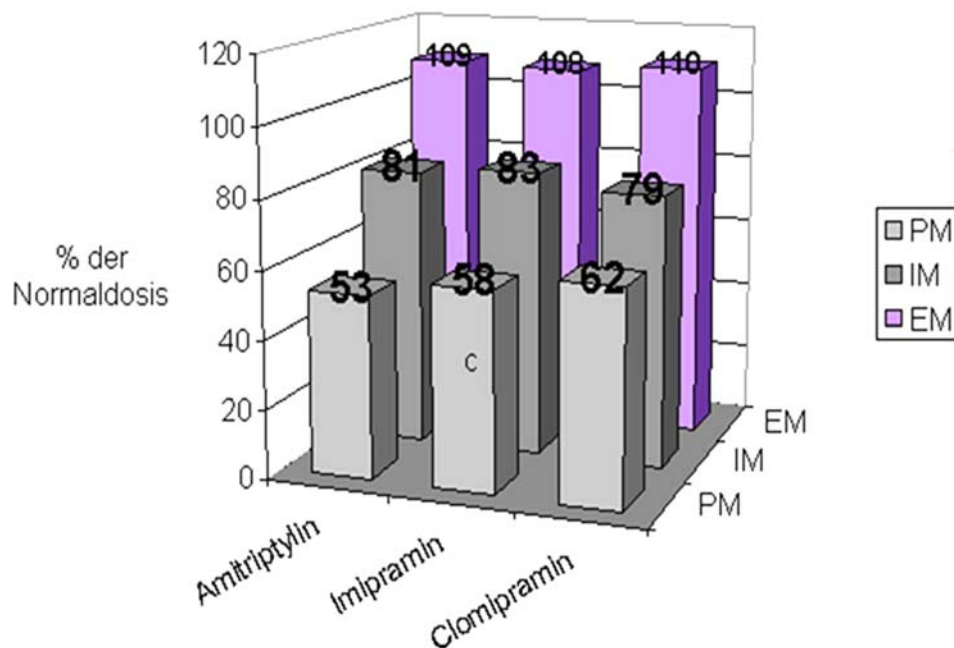


Abbildung 5: Dosisanpassungen von trizyklischen Antidepressiva in Abhängigkeit vom CYP2C19-Genotyp. Die Empfehlungen werden als Prozentwert der vom Hersteller empfohlenen Dosis angegeben (nach Kirchheiner et al., 2004).

Bisherige Studien mit trizyklischen Antidepressiva ergaben einen klinisch signifikanten Einfluss des CYP2C19-Polymorphismus auf deren Pharmakokinetik. Im Durchschnitt wiesen CYP2C19-PMs die doppelte AUC als EMs auf und entsprechend wurde eine Dosisanpassung von etwa 60 % und 110 % der Normaldosis für PMs bzw. EMs berechnet (Kirchheiner et al., 2004, siehe *Abbildung 5*). Klinische Studien zum Ausmaß des CYP2C19-Polymorphismus auf die Metabolisierung von Doxepin und Trimipramin existieren bislang keine.

1.6 Herleitung der Aufgabenstellung

Trizyklische Antidepressiva sind charakterisiert durch eine geringe Therapiebreite bei großen interindividuellen Unterschieden der Plasmakonzentrationen und spätem Wirkungseintritt. Hierdurch treten häufig durch relative Überdosierung bedingte uner-

wünschte Nebenwirkungen auf wie beispielsweise Müdigkeit, Mundtrockenheit, Schwindel und Herzrhythmusstörungen. Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, ob die Aktivität arzneimittelmetabolisierender Enzyme den Metabolismus der trizyklischen Antidepressiva Doxepin und Trimipramin beeinflusst und somit für unerwünschte Effekte dieser Medikamente disponiert.

1. Es soll die Bedeutung genetischer Polymorphismen der Enzyme CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 auf die Pharmakokinetik und Wirkung von Doxepin und Trimipramin anhand einer Einmalgabe an gesunden Probanden, die homo- bzw. heterogene Träger genetischer Polymorphismen der obigen Enzyme sind, in einer kontrollierten klinischen Studie untersucht werden.
2. Hauptzielgröße ist die Messung genetisch bedingter Unterschiede in der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) von Doxepin und Trimipramin. Nebenzielgrößen sind die Eliminationshalbwertszeit, die maximale Blutkonzentration, die totale Clearance, die Resorptionsverzögerungszeit sowie die Plasmakonzentrationen der Hauptmetaboliten
3. Anhand der zu erwartenden Unterschiede der AUCs soll erwogen werden, welches Enzym von klinischer Bedeutung bei der Gabe des jeweiligen Medikaments ist und eine Dosisanpassung in Abhängigkeit des Genotyps dieses Enzyms errechnet werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Probandenrekrutierung und Studiendurchführung

2.1.1 Studiendesign

Dieser Arbeit liegt eine kontrollierte offene prospektive Studie an 42 gesunden Probanden zugrunde, die in Abhängigkeit ihres CYP2D6-, CYP2C19- bzw. CYP2C9-Genotyps in 6 Gruppen eingeteilt werden und bezüglich pharmakokinetischer Unterschiede nach oraler Einnahme einer Einmaldosis Doxepin und Trimipramin mit der Gruppe der Wildtyp-Träger dieser Polymorphismen verglichen werden. Die Studie wurde nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission gemäß den Richtlinien der Good Clinical Practice am Institut für klinische Pharmakologie der Charité durchgeführt. Die teilnehmenden Probanden wurden durch die die Studien betreuenden Ärzte und Doktoranden schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

2.1.2 Probandenauswahl und Einschlusskriterien

Es wurden 9 Frauen und 33 Männer nach ihrem CYP2D6-, CYP2C9- und CYP2C19-Genotyp aus einem Kollektiv von 516 genotypisierten Individuen ausgesucht und in 6 Gruppen nach folgendem Schema eingeteilt: jeweils 8 bzw. 7 Träger eines inaktiven Allels (intermediäre Metabolisierer) und 8 bzw. 7 Träger von zwei inaktiven Allelen (langsame Metabolisierer) der Gene CYP2D6 bzw. CYP2C19 und 4 Probanden, die den langsam metabolisierenden Genotyp $*3/*3$ für CYP2C9 aufwiesen. Als Kontrolle diente eine Gruppe aus 8 Probanden, die Träger zweier aktiver (Wildtyp) Allele jedes der drei untersuchten Gene waren. Das Durchschnittsalter betrug 37 Jahre (22 -66 Jahre), das durchschnittliche Gewicht 76 kg (55 – 110 kg) und der Body-Mass-Index 23. Die demografischen Daten und die Genotypen der Studienteilnehmer sind in *Tabelle 5* aufgelistet. Alle Probanden waren Nichtraucher. Da genetische Untersuchungen zum Arzneimittelstoffwechsel durchgeführt wurden, sollten alle Studienteilnehmer aus einer einheitlichen Population, in diesem Falle kaukasischer Abstammung, sein, um das Risiko systematischer Fehler zu verringern. Es wurde eine Anamnese, eine allgemeinärztliche Untersuchung sowie ein Routine-laborscreening durchgeführt. Im Rahmen dieser Laboruntersuchung wurde ein kleines Blutbild mit Bestimmung von Hb, Hämatokrit, Erythrozyten- und Leukozytenzahl

durchgeführt sowie Gerinnungsparameter, Elektrolyte, GOT, GPT, γ -GT, AP, Quick-Wert, Albumin, gesamtes Bilirubin, Harnstoff und Kreatinin ermittelt. Zum Ausschluss einer Hepatitis A oder B wurden HbsAg und Anti-HCV bestimmt. Darüber hinaus wurde ein HIV-Test durchgeführt und bei Frauen Beta-HCG zum Ausschluss einer Schwangerschaft gemessen. Die Probanden erhielten schriftliche und mündliche Erläuterungen zu Studieneinschränkungen und Ernährungshinweisen.

Tabelle 5: Genotyp und demografische Daten der Studienteilnehmer

n	Genotypen						Alter (Jahre) Durchschnitt (Schwankungsbreite)	BMI (kg*m ²) Durchschnitt (Schwankungsbreite)	Anzahl der Frauen
	CYP2D6		CYP2C9		CYP2C19				
8	*1/*1	EM	*1/*1	EM	*1/*1	EM	30 (22-40)	22 (20-23)	2
7	*1/*4	IM	*1/*1	EM	*1/*1	EM	33 (26-45)	24 (22-27)	1
1	*1/*5								
6	*4/*4								
1	*4/*5	PM	*1/*1	EM	*1/*1	EM	49 (26-63)	24 (22-30)	1
1	*3/*5								
4	*1/*1	EM	*3/*3	PM	*1/*1	EM	46 (27-66)	24 (22-25)	2
7	*1/*1	EM	*1/*1	EM	*1/*2	IM	31 (26-40)	23 (20-25)	2
6	*1/*1	EM	*1/*1	EM	*2/*2	PM	37 (26-53)	24 (19-30)	1
1	2x*2/*4 [§]								

[§] : Ein EM von CYP2D6 wies eine Genduplikatur in Kombination mit einem defizienten CYP2D6-Allel auf. Diesen Genotyp betrachteten wir als äquivalent zu zwei aktiven Allelen.

2.1.3 Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien galten alle körperlichen und seelischen Erkrankungen und jegliche Medikamenteneinnahme. Insbesondere Erkrankungen oder vorausgegangene Operationen des Magen-Darm-Trakts, der Niere und der Leber waren strenge Ausschlusskriterien, da sie Einfluss auf die Pharmakokinetik der Medikamente nehmen können. Aufgrund der erhöhten Gefahr kardialer und zentralnervöser Nebenwirkungen wurden Probanden mit neurologischen, insbesondere epileptischen, Erkrankungen sowie Erkrankungen des Reizleitungssystems des Herzens von der Studie ausgeschlossen. Da Ethanol, Tabakrauch und begleitende Medika-

menteneinnahme die Aktivität von Cytochrom-Enzymen beeinflussen, galten diese Faktoren als Ausschlusskriterien. Einen Überblick gibt *Tabelle 6*.

Tabelle 6: Körperliche Erkrankungen und weitere Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien	Diagnostik
Herz- und Kreislauferkrankungen	EKG, RR, Anamnese
Diabetes mellitus Typ I und II	Nüchtern-BZ, Anamnese
Leber- und Nierenerkrankungen	Laborparameter, Anamnese, körperliche Untersuchung
Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts	Anamnese, Labor mit kleinem Blutbild
ZNS-Erkrankungen, Schädelhirntraumata, epileptische Erkrankungen	Anamnese
Alkoholabusus, Drogenabusus	Drogenscreening, Blutalkohol, Anamnese, körperliche Untersuchung
Raucher	Anamnese, Nikotin- und Cotininspiegel
Hepatitis B und C, HIV	Virologische Untersuchung
Schwangerschaft	Anamnese, Beta-HCG-Bestimmung im Serum

Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen oder schwanger waren, wurden von der Teilnahme ausgeschlossen. Darüber hinaus konnten keine Probanden in die Studie eingeschlossen werden, die innerhalb der zurückliegenden zwei Monate vor Studienantritt an einer anderen Arzneimittelstudie teilgenommen oder aber Blut gespendet hatten, bei denen anamnestisch eine Arzneimittelallergie bekannt war oder die ganz allgemein klinische Befunde aufwiesen, die eine Teilnahme an der Studie hätten beeinträchtigen können.

2.1.4 Art und Dosis der verwendeten Arzneimittel

Die zu untersuchenden Substanzen wurden als orale Einmaldosen verabreicht. Die Probanden erhielten zu den jeweiligen Terminen 75 mg Doxepin (Aponal® 75, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) oder 75 mg Trimipramin (Stangyl® 75, Aventis, Frankfurt, Deutschland), was einer üblichen Einstiegsdosis bei Behandlungsbeginn entspricht.

2.1.5 Diätetische Maßnahmen

Jeweils 3 Tage vor der Applikation des Medikaments bis nach der letzten Blutentnahme sollten die Patienten den Genuss Xanthin-haltiger Speisen und Getränke wie

Schokolade, Bananen, Tee, Kaffee oder Coca Cola auf ein Minimum reduzieren, da Xanthine eine induzierende Wirkung auf Cytochrom-Enzyme ausüben. Die Einnahme von Drogen und Alkohol sowie der Verzehr von Grapefruitsaft oder -früchten war in diesem Zeitraum komplett untersagt. Am Einnahmetag sollten die Probanden von 22 Uhr des Vortages bis 4 h nach Medikamentenapplikation nüchtern bleiben. In diesem Zeitraum war Mineralwasser nach Belieben erlaubt und bei Hypoglykämiesymptomen Traubenzucker nach Absprache mit den die Studien begleitenden Ärzten.

2.1.6 Überprüfung der Probandencompliance und Vorsichtsmaßnahmen

Die Studienteilnehmer verpflichteten sich nach ausführlicher Aufklärung schriftlich, die Studieneinschränkungen einzuhalten. Unmittelbar vor der Einnahme der Testsubstanzen wurden die Probanden zu ihrem aktuellen gesundheitlichen Zustand sowie zu den diätetischen Maßnahmen befragt. Sie wurden darauf hingewiesen, dass im Verdachtsfall Blut- und Urinkontrollen zur Überprüfung ihrer Angaben durchgeführt und sie im Falle eines positiven Testergebnisses mit sofortiger Wirkung aus der Studie ausgeschlossen werden würden. Die Medikamentenapplikation erfolgte im Beisein eines Arztes.

Alle Probanden waren vor Studienbeginn über die häufigsten Nebenwirkungen ausführlich aufgeklärt und schriftlich informiert worden, ebenso wurde ihnen mitgeteilt unter welcher Telefonnummer der Studienarzt und Studienleiter während der gesamten Untersuchung erreichbar sei.

2.1.7 Studienablauf

Die Kinetikmessung erstreckte sich über jeweils 72 Stunden. In diesem Zeitraum erfolgten insgesamt 13 Blutentnahmen. Am ersten Kinetiktag wurden die Probanden stationär aufgenommen, während an den weiteren 3 Tagen die Blutentnahmen ambulant geschahen. Vor der Medikation am ersten Tag erhielten die Studienteilnehmer eine venöse Verweilkanüle, mit der nach 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 Stunden jeweils 8 ml EDTA-Blut zur Bestimmung des Medikamentenspiegels und seiner Metaboliten gewonnen wurde. 4 Stunden nach der Medikamenteneinnahme war es den Probanden erlaubt, erstmals eine Mahlzeit zu sich zu nehmen. Nach der letzten Blutentnahme wurde der venöse Zugang entfernt, woraufhin die Probanden das Institut verlassen konnten. Die folgenden 4 Blutentnahmen waren auf 24, 36, 48 und 72

Stunden nach der Medikation angesetzt, bei denen jeweils noch eine 8ml-EDTA-Monovette durch Punktion einer Armvene entnommen wurde. Das Gesamtvolumen des entnommenen Bluts betrug folglich rund 104 ml pro Medikament. Der Abstand zwischen zwei Medikamentenverabreichungen betrug mindestens 21 Tage, was mehr als 5 Halbwertszeiten der Substanzen und ihrer Metaboliten entspricht.

2.1.8 Erfassung von Nebenwirkungen

Während der Kinetikmessungen aufgetretene Nebenwirkungen wurden insgesamt 4-mal je Medikament erhoben. Um kardiale Begleiterscheinungen zu erfassen, wurden vor der Medikation sowie 3 h, 10 h und 72 h danach ein EKG geschrieben und der Blutdruck gemessen. Zur Erfassung weiterer unerwünschter Medikamenteneffekte sollten die Probanden zu den gleichen Zeitpunkten Fragebögen zur Selbstbeurteilung bezüglich Vigilanz, Nervosität, Akkomodationsvermögen, Schüttelfrost, Schwitzen, Zittern, Kopfschmerzen, Schwindel, Herzklopfen, Übelkeit und Mundtrockenheit ausfüllen. Alle Nebenwirkungen wurden in offenen Fragebögen, die keine Rückschlüsse auf das verabreichte Medikament zuließen, schriftlich dokumentiert.

2.1.9 Dokumentation der Studie

Die erhobenen Daten (Anamnese, Laborergebnisse, unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen, Blutentnahme- und Laborprotokolle) wurden in *Case Report Forms* (CRFs) eingetragen, die zusammenhängend für 15 Jahre im Institut für Klinische Pharmakologie der Charité aufbewahrt werden. Eine Entnahme einzelner Blätter ist nicht gestattet.

2.1.10 Datenschutz und Vertraulichkeit der Daten

Die Probandendaten wurden in anonymisierter Form erhoben. Jeder Proband erhielt eine individuelle Code-Nummer. Die Zuordnung von Proband und Code ist nur den an der Studie mitarbeitenden Doktoranden und Ärzten bekannt und wird nicht an Dritte weitergegeben. Die Daten sind computergesteuert verwaltet und gespeichert. Ein Datenzugriff anderer auf die personenbezogenen Daten ist nur nach Genehmigung durch die Probanden selbst möglich.

2.1.11 Fehlerminimierung

Die in der Studie verwendeten Medikamente wurden bei den einzelnen Probanden in unterschiedlicher Reihenfolge gegeben, um systematische Fehler wie Ermüdung

oder Gewöhnung im Verlauf der Gesamtstudie zu verringern. Eine Blindung wurde nicht vollzogen, da die Hauptzielgröße der Studie, der Plasmamedikamentenspiegel, nicht von der subjektiven Wahrnehmung der Probanden oder Studienärzte abhängig ist. Subjektiv erhobene Daten wie die offenen Fragebögen zu den Medikamentennebenwirkungen wurden dokumentiert, besitzen jedoch keine Beweiskraft. Hinsichtlich wesentlicher Einflussgrößen wie Körpergewicht, Geschlecht oder Alter erfolgte eine Adjustierung, so dass die Gruppe der Langsammetabolisierer jeweils vergleichbare Eigenschaften wie die Kontrollgruppe aufwies.

2.1.12 *Versicherungsschutz*

Gemäß den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes waren die Probanden über 500000 € gegen die bei Blutabnahmen potenziell auftretenden Schäden sowie gegen die nicht therapeutisch indizierte Einnahme der Testsubstanzen versichert.

2.1.13 *Weiterverarbeitung und Aufarbeitung der Proben zur Messung der Medikamentenplasmakonzentration*

Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme zehn Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert und das so gewonnene Blutplasma wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C in Eppendorf-Cups gelagert.

2.2 Genotypisierung

Zur DNA-Extraktion wurden pro Proband etwa 5 ml venöses Blut einer aufgetauten EDTA-Monovette benötigt. Die zu untersuchende DNA konnte dann aus den kernhaltigen Leukozyten gewonnen werden.

2.2.1 *Erythrozytenlyse*

Zu mindestens 3 ml aufgetautem Vollblut wurden 35 ml Ery-Lyse-Puffer dazugegeben und kurz gemischt. Durch diesen Vorgang werden die kern- und DNA-losen Erythrozyten zerstört, während kernhaltige Blutbestandteile aufgrund ihrer höheren Membranstabilität intakt bleiben. Um das DNA-haltige Zellsediment zu isolieren und für die DNA-Extraktion vorzubereiten, wurden die Proben anschließend für 30 min bei 2000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und nach Zugabe von 1,5 ml TEN-Puffer (bestehend aus Tris/HCl, EDTA und NaCl) bei -20° C eingefroren.

2.2.2 DNA-Extraktion

In einem zweiten Schritt konnte die in den Leukozyten enthaltene DNA mithilfe des Phenol-Chloroform Verfahrens extrahiert werden. Hierzu mussten zuerst die Zellsedimente mit 1,5 ml Lyse-Puffer und 100 µl Proteinase-K-Lösung bei 37° C für 12 h verdaut werden. Zur Ausfällung der Proteine versetzte man das Reagens mit 1,5 ml einer Phenol-/ Chloroform-Lösung und zentrifugierte es. Zur Eliminierung verbliebener Lipidbestandteile wurde im Rahmen der Chloroform-Nachextraktion die obere wässrige Phase abpipettiert und nochmals mit 1,5 ml Chloroform versetzt und zentrifugiert. Danach folgte die DNA-Präzipitation. 2 ml des Überstands wurden mit 6 ml 96%-igem Ethanol und 100 µl 3M Natriumacetat (pH 5,5) überpipettiert und zentrifugiert, woraufhin die ausgefällte DNA schließlich am Boden der Gefäße haftete. Der Überstand wurde abgegossen, die DNA durch Zugabe von 3 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert. Nachdem der dabei entstehende Überstand abgegossen worden war, wurden die Proben für 30 min auf dem Kopf stehend auf Zellstoffpapier gestellt, so dass der verbliebene Alkohol abtropfen und verdunsten konnte. Abschließend wurde die DNA in TEN-Puffer (10 mM Tris-Puffer / 1 mM EDTA, pH 8) aufgelöst bei 4° C bis zur PCR in sterilen Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine *In-vitro*-Technik, die eine milliardenfache Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen in zellfreiem Milieu ermöglicht und diese somit für weitere Analyseverfahren zugänglich macht. Zur Durchführung einer PCR wird in einem Thermocycler, der die vollautomatische Steuerung von Temperaturzyklen gewährleistet, eine Reaktionspufferlösung mit folgenden Stoffen gegeben: eine geringe Menge doppelsträngige DNA, eine hitzestabile DNA-Polymerase (sog. *Taq*-Polymerase), die bei Temperaturen von 90 - 95° C nicht denaturiert, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie zwei synthetische Oligonucleotid-Primer, die zu Sequenzen beiderseits des DNA-Abschnittes, den man vervielfältigen möchte, komplementär sind. Das Prinzip lässt sich vereinfacht in 3 Schritte einteilen (siehe *Abbildung 6*). Im ersten Schritt werden beide Stränge der DNA durch Temperaturerhöhung auf 94° C getrennt (Denaturierung). Nach Abkühlung auf 57 - 60° C binden die Primer im zweiten Schritt an die entsprechenden Stellen der einsträngigen DNA-Matrize (Hybridisierung). Im dritten Schritt erfolgt bei einer für die

Funktion der DNA-Polymerase optimalen Reaktionstemperatur die Verlängerung der Primer und die Synthese komplementärer DNA-Sequenzen (DNA-Synthese). Am Ende dieses Zyklus, der etwa 5 min dauert, liegen 2 neu synthetisierte Doppelstränge vor, die zunächst noch keine definierte Länge haben. Da sie aber im nächsten Zyklus selbst als Matrizen verwendet werden und an ihren Enden die Oligonukleotidsequenz der Primer tragen, entstehen ab dem dritten Durchlauf nur noch Produkte gewünschter Länge. Ab dem vierten Durchlauf erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz. Nach über 30 Durchläufen liegt die DNA theoretisch 2^{30} -mal vor. Der Vorteil an dieser Synthesemethode ist, dass die *Taq*-Polymerase hitzestabil ist und somit die aufeinander folgenden Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte einander abwechseln können, ohne dass zwischendurch neues Enzym beigefügt werden muss.

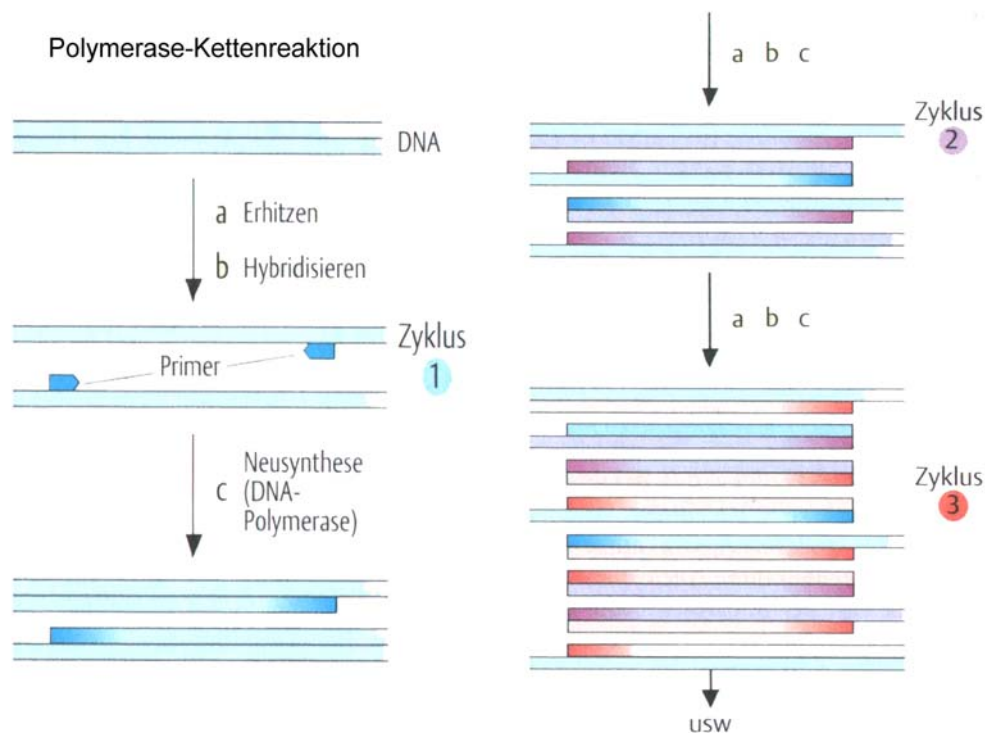


Abbildung 6: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion

2.2.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)

Die so entstandenen amplifizierten DNA-Stücke werden zum Zweck der RFLP-Analyse mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Dies sind Enzyme, die die DNA sequenzspezifisch schneiden und somit in der Regel DNA-Fragmente ähnlicher Länge produzieren. Jedoch können individuelle Unterschiede in der Nucleotid-Se-

quenz Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen betreffen, so dass allele Genombereiche in unterschiedliche Fragmente zerlegt werden. Das Vorliegen unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach Verdau durch Restriktionsenzyme wird als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus bezeichnet. Die vervielfältigte und geschnittene DNA kann im nächsten Schritt durch eine Agarosegelelektrophorese untersucht werden. Die Fragmente wandern abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die netzähnlichen Polysaccharidstrukturen des Agarosegels und werden schließlich durch intercalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dieses Verfahren dient der gezielten Suche bekannter Mutationen mithilfe spezifischer Enzyme, wie beispielsweise der dieser Arbeit zugrunde liegenden CYP2D6-, CYP2C9- und CYP2C19- Polymorphismen.

2.2.5 Bestimmung des Cyp2D6-Allels durch PCR-RFLP-Tests

Die Bestimmung der CYP2D6-Allele erfolgte mittels PCR-RFLP-Tests, wie sie von *Sachse et al.* beschrieben worden sind. Hierbei reichen 5 PCR-RFLP-Reaktionen aus, um die Allele *3, *4, *5, *6, *8, *12, *14 und *15 sowie die Genduplikationen CYP2D6*2xN zu ermitteln (*Sachse et al.*, 1997; *Johansson et al.*, 1996). Um mögliche Fehlerquellen durch Koamplifikationen der beiden benachbarten homologen Pseudogene CYP2D7 und CYP2D8 zu vermeiden, wird zuerst das gesamte CYP2D6-Gen mit einer Länge von 4681 bp amplifiziert. Hierbei verwendete man das *Expand Long Template PCR System*[™] (Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland), das mit einem Gemisch der DNA-Polymerasen *Taq* und *Pwo* arbeitet und in der Lage ist, Fragmente bis zu einer Länge von 20kb zu vervielfältigen. Im zweiten Schritt werden mittels der *nested* PCR-Technik die 3 DNA-Abschnitte, auf denen sich die Punktmutationen für die Allelvarianten *3, *4, *6, *8, *12, *14 und *15 befinden, spezifisch amplifiziert. Einen Überblick über die Durchführung der beiden PCR-Techniken gibt *Tabelle 8*. Zur Kontrolle weist man die entstandenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch auf 1%-Agarosegel nach und dokumentiert sie mit einem digitalen Videosystem (Eagleeye[™], Fa. Stratagene). Im letzten Schritt werden die vervielfältigten Genabschnitte mittels Restriktionsendonukleasen (Fa. Biolabs New England) verdaut und die DNA-Fragmentlängen auf einem 3% Agarosegel elektrophoretisch analysiert und fotografisch dokumentiert (siehe *Tabelle 7*).

Zur Detektion einer Gen-Duplikation wurde eine Methode angewandt, die *Johansson et al.* beschrieben. Prinzipiell wird hierbei ein DNA-Segment spezifisch

amplifiziert, was zwischen dem Exon 9 von CYP2D6*2B und Intron 2 von CYP2D6*2A gelegen und somit nur bei Probanden mit dieser Duplikation vorhanden ist. Fällt die PCR positiv aus, entsteht also ein vervielfältigtes DNA-Fragment, kann man von einer Probe mit einer CYP2D6-Duplikation ausgehen.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Mastermixe für die einzelnen PCR-RFLP-Reaktionen (nach Sachse et al., 1997)

	Long-Amplifikation eines 4681 bp großen DNA-Frag- ments (50 µl) und Reaktion 3	Nested-PCRs: Reaktionen 1 und 2 (50 µl):	Nested-PCRs: Reaktion 4 (65 µl)
Zusammensetzung des Mastermix	50 mM Tris-HCl pH 9,2 1,75 mM MgCl ₂ 16 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 135 µM dNTPs Je 0,5 µM Primer P100 und P200 4 U eines <i>Taq</i> - und <i>Pwo</i> - Polymerasen-Mix 0,5 µg DNA	10mM Tris-HCl pH 8,3 1,25 mM MgCl ₂ 50 mM KCl 200 µM dNTPs 0,2 µl der Primer P*3, P2 für Reaktion 1 und P51, P522 für Reaktion 2 2,5 U <i>Taq</i> -Polymerase 1 µl des PCR-Produkts der Long- Amplifikation	10mM Tris-HCl pH 8,3 1,25 mM MgCl ₂ 50 mM KCl 160 µM dNTPs Je 0,1 µM der Primer P11 und P12 2,5 U <i>Taq</i> -Polymerase 1 µl des PCR-Produkts der Long- Amplifikation
Cycler	2 min. 94°C – 35 x (10 s 93°C, 30 s 60°C, 5 min. 68°C) – 7 min. 68°C	2 min. 94°C - 25 x (30 s 94°C, 10 s 60°C, 1 min. 72°C) – 7 min. 72°C	2 min. 94°C - 25 x (30 s 94°C, 10 s 58°C, 1min 72°C) – 7min. 72°C

Tabelle 8: Design der PCR-RFLP-Tests für CYP2D6-Mutationen (nach Sachse et al., 1997)

PCR-Reaktionen-Nr. und detektierte Mutationen		PCR-RFLP-Parameter			Muster der Fragmentlängen	
		PCR- Primer	Fragment- länge (bp)	Restriktions- enzyme	Wildtypallel	Mutantenallel
1:	Del T ₁₇₉₅ : *6	P*3/P2	353	<i>Bst</i> NI	190/163	190/139/23
	G ₁₉₃₄ A: *4	190/163	353
	G ₁₈₄₆ T/A: *8/*14	<i>Msp</i> I	278/75	353
2:	Del A ₂₆₃₇ : *3	P51/P522	201	<i>Bsa</i> AI	201	180/20
3:	Kompl. Del.: *5	P13/P24	3500	...	Kein	3500
4:	C ₁₈₈ T: *4, *10, *14	P11/P12	433	<i>Hph</i> I	362/71	262/100/71
	G ₂₁₂ A: *12	<i>Msp</i> I	242/141/50	242/191
	Ins T ₂₂₆ : *15	<i>Bsp</i> MI	157/156/120	278/156
5:	CYP2D6*MxN	P2x2f/P2x2r	10000	...	Kein	10000

2.2.6 Bestimmung des CYP2C9-Allels durch PCR-RFLP-Tests

Die Bestimmung der Allele *2 und *3 sowie des Wildtypallels erfolgte nach der von Sullivan-Klose et al. beschriebenen Methode. Hierzu wird 1 µl genomischer DNA jeweils 25 µl des in Tabelle 9 beschriebenen Mastermix zugesetzt, um eine gezielte

Amplifizierung der 2 DNA-Segmente, die die beiden Punktmutationen enthalten, zu erhalten. Ebenso wie bei der CYP2D6-Genotypisierung wird das PCR-Produkt kontrolliert, indem es, mit Bromphenolblaupuffer gemischt, auf 1% Agarosegel aufgetragen wird, woraufhin nach Elektrophorese in einer Protrans-Kammer für 30 min bei 120 Volt im Fall von *Cyp2C9*2* eine 372 bp-Bande, im Fall von *Cyp 2C9*3* eine 137 bp-Bande entstehen sollte. Im Erfolgsfall werden die entstandenen 2 Typen von DNA-Fragmenten mit einem Enzymmastermix versetzt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zur Auswertung in der Elektrophorese wird die Probe nach Zugabe von 10 µl Bromphenolblaupuffer auf 3,5% Agarosegel aufgetragen und für 60 min. bei 100 Volt aufgetrennt (Sullivan-Klose et al., 1996). Die entstehenden Restriktionsmuster für die unterschiedlichen Genotypen können dann abgelesen und zu Dokumentationszwecken fotografiert werden. Sie sind in *Tabelle 9* im Detail dargestellt.

Tabelle 9: Durchführung und Ergebnisse von PCR-RFLP und Gelelektrophorese

	Cyp2C9*2 (Arg₁₄₄Cys)			Cyp2C9*3 (Ile₃₅₉Leu)		
PCR-Mastermix	10 x Perkin Elmer Puffer 2,5 ml MgCl ₂ (25 mM) 1,5ml dNTPs (2 mM) 2,5ml H ₂ O (steril, bidest) 17,35ml Primer 2CL1 (10 mM) 0,5ml Primer 2CR1 (10 mM) 0,5ml AmpliTaQ Polymerase 0,15 ml			10 x Perkin Elmer Puffer 2,5 ml MgCl ₂ (25 mM) 1,5ml dNTPs (2 mM) 2,5ml H ₂ O (steril, bidest) 17,35ml Primer C5 (10 mM) 0,5ml Primer 2C9-6A (10 mM) 0,5ml AmpliTaQ Polymerase 0,15 ml		
Cycler	2min 94°C– 35 x(30s 94°C– 10s 60°C–1min 72°C)–7min 72°C–4°C			2min 94°C– 35 x (30s 94°C– 10s 57°C– 40s 72°C)– 7min 72°C– 4°C		
Restriktionsenzym	Sau 96I			Styl		
Enzymmastermix	7 ml bidest. Wasser 2 ml Puffer (Neb4, Fa.New England Biolabs) 1 ml Sau 96I			6,5 ml bidest. Wasser 2 ml Puffer (Neb3, Fa.New England Biolabs) 1,5 ml Styl		
Genotyp	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*1	*1/*3	*3/*3
Codierung	0	1	2	0	1	2
Muster (bp)	-	253	253	-	104	104
	179	179	-	137	137	-
	119	119	119	-	104	104
	74	74	-	-	33	33

2.2.7 Bestimmung des CYP2C19-Allels durch PCR-RFLP-Tests

Aufgrund der kaukasischen Abstammung der Probanden führten wir bei der Genotypisierung nur einen PCR-RFLP-Test zur Ermittlung des *2-Allels durch. Hierzu wird

1 µl DNA zu 25 µl des Mastermix gegeben, wie er in *Tabelle 10* beschrieben ist. Zur Kontrolle wird das PCR-Produkt mit der gleichen Methode wie bei CYP2C9 einer Elektrophorese unterzogen, bei der es im Erfolgsfall eine 190bp-Bande abbildet. Im anschließenden Verdau wird das Restriktionsenzym *SmaI* benutzt, welches exakt bei dem Basenpaar des Wildtyps spaltet, welches bei der inaktiven Allelvariante ausgetauscht ist. Das DNA-Fragment des Wildtyps wird somit in zwei Teile von 120 und 49 Basenpaaren gespalten, während die Mutation als ein 169 bp langes DNA-Stück unverdaut bleibt. Während der abschließenden Elektrophorese auf 3%-Agarosegel lassen sich diese Banden wie in *Tabelle 10* dargestellt sichtbar machen.

Tabelle 10: Durchführung und Ergebnisse von PCR-RFLP und Gelelektrophorese von CYP2C19

PCR-Mastermix (25µl)	10 x Perkin Elmer Puffer 2,5 µl MgCl ₂ (25mM) 1,25 µl dNTPs (2mM) 0,75 µl H ₂ O (steril, bidest.) 19,1 µl Primer mep f (10µM) 0,625 µl Primer mep r (10µM) 0,625 µl AmliTaq Polymerase 0,15 µl		
Cycler	2 min. 94° C – 38 x (30s 94° C – 30s 58° C – 1 min. 72° C) – 7 min. 72° C		
Restriktionsenzym	<i>SmaI</i>		
Enzymmastermix	20 µl PCR-Produkt 6 µl H ₂ O (steril, bidest.) 3 µl Puffer NEB 4 (Fa. New England Biolabs) 1 µl <i>SmaI</i>		
Genotyp	*1/*1	*1/*2	*2/*2
Codierung	0	1	2
Muster (Basenpaare)	-	169	169
	120	120	-
	49	49	-

2.3 Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse

2.3.1 Prinzip der Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse

2.3.1.1 Extraktion

Der eigentlichen Konzentrationsbestimmung wird die Extraktion der Substanz aus den Plasmaproben vorangestellt. Diese dient einer gewissen Vorreinigung und Anreicherung, womit ihre Detektion in der folgenden Chromatographie vereinfacht wird. Der Probe wird im Regelfall ein Interner Standard (IS) zugesetzt. Es handelt sich hierbei um eine bekannte Menge einer Substanz, die dem zu untersuchenden Stoff chemisch verwandt ist und mit deren Hilfe die Vollständigkeit der Extraktion beurteilt werden kann.

2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung ist stark abhängig von äußeren Einflüssen, weswegen im vorhinein eine Kalibrierkurve mithilfe von Kalibrierstandards erstellt wird. Hierzu werden bei jeder Messung die Konzentrationen, die den aufgrund der gängigen Literaturdaten zu erwartenden Konzentrationsbereich umfassen sollten, einer ausreichenden Anzahl von Eichproben bestimmt. Unter Berücksichtigung eventueller Verluste bei der vorausgegangenen Extraktion werden die Quotienten der Peakhöhen des Analyten und des Internen Standards gebildet (Analyt / IS). Die Berechnung der Kalibrierkurve erfolgt dann mittels linearer Regression der Peakflächenquotienten der Kalibrierstandards gegen die Konzentration.

2.3.1.3 Durchführung der HPLC

Zur Bestimmung der Plasmamedikamentenkonzentrationen wurde die Methode der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) angewandt, welche sich durch besonders hohe Trennschärfe und Empfindlichkeit, hohe Kapazität und vergleichsweise schnelle Durchführbarkeit auszeichnet. Das ihr zugrunde liegende Prinzip ist die Verteilungschromatographie, bei der sich Stoffe aufgrund unterschiedlicher Affinität zu zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen zwischen diesen verteilen. Eine der Phasen, die stationäre Phase, ist an einen festen Träger gebunden, an dem die andere mobile Phase

entlangfließt. Im Fall der so genannten RPLC (Reversed Phase Liquid Chromatography) besteht die stationäre Phase aus Kieselgelteilchen, an die *hydrophobe* Substanzen kovalent gebunden sind, und die mobile Phase aus einer pufferhaltigen wässrigen Lösung, die mit einem *hydrophilen* organischen Lösungsmittel gemischt ist. Die Trennung eines Stoffgemischs durch die HPLC kommt dadurch zustande, dass die verschiedenen in der mobilen Phase gelösten Komponenten je nach ihrer Affinität zur stationären Phase langsamer als das Lösungsmittel durch die Säule wandern und sich somit abhängig von ihren hydrophoben Eigenschaften auftrennen.

Die einzelnen Stoffe werden abschließend mittels eines nach dem Prinzip der Absorptionsfotometrie messenden UV-Durchflussdetektors bestimmt. Hierbei wird die Intensitätsabschwächung (Extinktion) eines eine Probe durchlaufenden Lichtstrahls gemessen, woraus ihre molare Konzentration bestimmt werden kann. Bei diesem Schritt wird auf die oben beschriebene Kalibrierkurve zurückgegriffen. Aus den normierten Messwerten der zu bestimmenden Proben lassen sich nun anhand der erhaltenen Regressionsparameter die unbekannten Konzentrationen ermitteln.

2.3.1.4 Statistische Qualitätskontrolle der Analyseergebnisse

Mithilfe der statistischen Qualitätskontrolle kann bei quantitativen Bestimmungen die Präzision (Erfassung zufälliger Fehler) systematisch kontrolliert und überwacht werden. Künstliche Qualitätskontrollproben mit bekannten Konzentrationen werden in eine Analysenserie eingefügt und unter den gleichen Bedingungen wie Patientenproben analysiert. Das Prinzip der statistischen Qualitätskontrolle besteht darin, dass vom Analyseergebnis der Kontrollproben auf die Zuverlässigkeit der Probandenwerte geschlossen wird.

Bestimmungsgrenze. Die Bestimmungsgrenze lässt sich beschreiben als die kleinste messbare Konzentration eines Analyten, die noch mit einer definierten Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann ($\pm 20\%$). Sie wird mithilfe von Kalibrierstandards festgelegt

2.3.2 HPLC von Doxepin und N-Desmethyldoxepin

2.3.2.1 Durchführung der HPLC von Doxepin und N-Desmethyldoxepin

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Gesamtdoxepin, also die Summe beider Isomere, und seinem Metaboliten N-Desmethyldoxepin wurde mittels einer validierten HPLC-Methode mit UV-Detektion durchgeführt (Meyer-Barner et al., 2002).

Extraktion. 1 ml des aufgetauten Blutplasmas wurde mit 200 µl Natriumkarbonat (1,0 M) und 150 ng eines Internen Imipraminstandards (IS) versetzt. Der Mischung wurden 6 ml eines Lösungsmittels, bestehend aus N-Hexan und Acetonitril (98:2), zugegeben und 10 min. im Überkopfschüttler extrahiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 4000 U/min. konnte die organische Phase entfernt und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur mit Stickstoff verdampft werden. **Durchführung.** Der so gewonnene Rückstand wurde im nächsten Schritt in 200 µl der mobilen Phase gelöst. Diese bestand aus einer wässrigen Mischung aus 5 mM Phosphatpuffer (pH 6), Methanol und Acetonitril im Volumenverhältnis von 19:32:49. Die Chromatographie erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 1,5 ml/min auf einer LiChrospher™ reversed phase Trennsäule (125 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße, Merck, Darmstadt). Unter diesen Voraussetzungen wiesen Doxepin, IS und N-Desmethyldoxepin Retentionszeiten von 4, 5 und 6 min auf. Die Konzentrationen der Substanzen wurden mithilfe eines UV-Durchflussdetektors (LiChroGraph 7485, Merck, Darmstadt) bei einer Wellenlänge von 210 nm gemessen und der Quotient der Peakflächen des Analyten und des internen Standards berechnet.

2.3.2.2 Kalibrierstandards und statistische Qualitätskontrolle für Doxepin und N-Desmethyldoxepin

Bei jeder Messreihe wurden Kalibrierstandards im Konzentrationsbereich von 7,9 nmol/l bis 158 nmol/l bestimmt. Zusätzlich wurden täglich Qualitätskontrollproben gemessen, deren Konzentrationen mit 63 nmol/l oder 95 nmol/l definiert waren. Bei 17 Konzentrationsbestimmungen wurden durchschnittlich 61,8 nmol/l (Standardabweichung 6,3) und 89,6 nmol/l (6,3) gemessen. Die Nachweisbarkeitsgrenze lag bei 3,167 nmol/l und der Variationskoeffizient unter 6,5 % für beide Doxepinkonzentrationen (63 und 95 nmol/l) und unter 10,5 % für beide N-Desmethyldoxepinkonzentrationen (66 und 99 nmol/l). Nach einer Analyse der Kalibrierstandards betrug der Variationskoeffizient aller gemessenen Konzentrationen weniger als 10 %, wobei er zwischen 7,9 und 317 nmol/l konzentrationsunabhängig schien.

2.3.3 HPLC der E- und Z-Isomere von Doxepin

2.3.3.1 Durchführung der HPLC der E- und Z-Isomere von Doxepin

Extraktion. Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben. Jedoch wurden für die Bestimmung 2 ml Plasma verwendet sowie eine Mischung aus Hexan,

Ethanol und Methanol (98:1:1, v/v/v) als Lösungsmittel. **Durchführung.** Für die Trennung der E- und Z-Isomere von Doxepin benötigte man einen Chromatographie-Apparat mit unterschiedlicher Selektivität. Als stationäre Phase wählte man Silica (LiChrospher Si60™, Merck, Darmstadt) und als mobile Phase eine wässrige Lösung bestehend aus N-Hexan, Ethanol, Methanol und Diethylamin (89:8:3:0,0005; v/v/v/v). Unter diesen Bedingungen betrugen die Retentionszeiten 8,9 min für E-Doxepin und 8 min für Z-Doxepin. Die Retentionszeiten der Metaboliten lagen bei über 70 min. Abschließend wurden die Isomere mit einer UV-Fotometrie bei einer Wellenlänge von 220 nm gemessen.

2.3.3.2 Kalibrierstandards und statistische Qualitätskontrolle der E- und Z-Isomere von Doxepin

Es wurden Kalibrierstandards mit Doxepinkonzentrationen zwischen 7,9 nmol/l und 143 nmol/l verwendet. Die Messungen wurden überwacht, indem Qualitätskontrollproben mitbestimmt wurden, deren Konzentrationen bei 32 nmol/l oder 127 nmol/l lagen. Die Durchschnittswerte wurden hierbei mit 33,6 nmol/l (SA: 5,4) bzw. 124,5 nmol/l (SA: 13,9) angegeben. Danach wurden die Quotienten E-Doxepin / (E-Doxepin + Z-Doxepin) sowie Z-Doxepin / (E-Doxepin + Z-Doxepin) berechnet. Unter Zuhilfenahme der Gesamtdoxepinkonzentration der Probe ließen sich hieraus die Isomerkonzentrationen bestimmen. Bei der Messung der Isomere lag die Bestimmungsgrenze bei 3,1 nmol/l für E-Doxepin und bei 0,6 nmol/l für Z-Doxepin.

2.3.4 HPLC von *razemischen Trimipramin*

2.3.4.1 Durchführung der HPLC von *razemischen Trimipramin* und *N-Desmethyltrimipramin*

Extraktion. Zur Vorbereitung wurden 1 ml der aufgetauten Plasmaprobe 25 µl des Internen Standards und 500 µl einer 1-molaren Natriumkarbonatlösung, deren pH-Wert zwischen 10 und 11 betrug, hinzugefügt. Als Internen Standard verwendete man 500 ng in Methanol gelöstes Imipramin. Diese Mischung wurde mit 5 ml einer Lösung aus N-Hexan und Acetonitril (98:2) versetzt und 10 min im Überkopfschüttler extrahiert. Nach Zentrifugierung wurde der organische Überstand mithilfe von Stickstoff verdampft und der Rückstand für die weitere Analyse verwendet. **Durchführung.** Im weiteren Schritt wurden zuerst 4,5 ml des Extrakts in 100 µl der mobilen Phase gelöst, welche sich aus 5 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6), Methanol und

Acetonitril im Volumenverhältnis 22:32:46 zusammensetzte. Zur Bestimmung von Trimipramin und seines Hauptmetaboliten N-Desmethyltrimipramin verwendete man ebenfalls eine *reversed phase* HPLC mit UV-Detektion. Die Chromatographie von 50 µl-Proben erfolgte auf einer LiChrospher 100 CN™-Säule (Merck, Darmstadt) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Konzentration mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 250 nm gemessen.

2.3.4.2 Kalibrierstandards und statistische Qualitätskontrolle von Trimipramin und N-Desmethyltrimipramin

Es wurden Kalibrierstandards für Trimipraminmaleat und Desmethyl-Trimipraminmaleat im Konzentrationsbereich von 2,5 µl bis 100 µl verwendet. Bei jeder Messreihe, die aus 22 Einzelmessungen bestand, wurden zwei Kontrollproben bestimmt, welche eine Konzentration von 10 µg/l oder 50 µg/l aufwiesen. Die Variationskoeffizienten lagen bei 8,7 % und 9,2 % bei den 10 µg/l-Trimipramin- und Desmethyltrimipraminproben bzw. bei 5,2 % und 10,5 % bei den 50 µg/l-Proben. Die Bestimmungsgrenze wurde mit 1 µg/l sowohl für Trimipramin als auch seinen Metaboliten angegeben.

2.4 Analyse der Messdaten und Statistik

2.4.1 Pharmakokinetische Begriffe und Parameter

Folgende pharmakokinetische Parameter wurden als Haupt- und Nebenzielgrößen verwendet. Ihre Berechnung und Bedeutung soll zum besseren Verständnis des Nachfolgenden kurz erläutert werden.

AUC (*area under the curve* = Fläche unter der Kurve). Die AUC dient als Messgröße für das Ausmaß der Bioverfügbarkeit im zentralen Kompartiment. Trägt man nach Medikamentenapplikation gemessene Plasmakonzentrationen gegen die Zeit auf, so bezeichnet man die Fläche unter der resultierenden Kurve als AUC. Anders ausgedrückt stellt die AUC das Integral der Konzentrationen über die Zeit dar. Am besten wird sie näherungsweise nach der Trapezregel bestimmt, wobei vom letzten Messzeitpunkt die Restfläche im Regelfall gegen unendlich extrapoliert wird. Dies setzt jedoch voraus, dass die Plasmakonzentrationen ausreichend lang verfolgt wurden, so dass mit hinreichender Präzision extrapoliert werden kann. Während sich in der AUC ausschließlich der *Umfang* der Bioverfügbarkeit niederschlägt, werden zur Quantifizierung ihrer *Geschwindigkeit* zwei weitere Zielgrößen gemessen, die

Spitzenkonzentration C_{\max} nach Einmalapplikation sowie der **Zeitpunkt t_{\max}** des Erreichens dieser Spitzenkonzentration. Die Höhe von C_{\max} ist von Bedeutung im Zusammenhang mit der erreichbaren therapeutischen Wirkung, möglicherweise aber auch mit der Häufigkeit unerwünschter Nebenwirkungen. Von geringerer Bedeutung ist t_{\max} anzusehen, da die Größe ausschließlich von der Resorptionsgeschwindigkeit abhängt.

Totale orale Clearance. Die totale orale Clearance ist der am meisten geeignete Parameter zur Charakterisierung und Quantifizierung aller Eliminationsprozesse. Sie beschreibt die Möglichkeit des Körpers und seiner Eliminationsorgane ein bestimmtes Volumen Blut pro Zeiteinheit von einem Arzneistoff zu klären, d.h. durch Metabolismus und/oder Exkretion eine verabreichte Substanz aus dem Körper zu eliminieren. Sie berechnet sich wie folgt: $Cl_{i.v.} = \text{Dosis}_{i.v.} / \text{AUC}$. Bei oraler Medikamentengabe kann nur die orale Clearance Cl_o berechnet werden, welche neben der systemischen Clearance auch mögliche präsystemische Clearanceanteile einschließt und die von der häufig unbekannten Resorptionsquote abhängt. Die Clearance ist additiv, d.h. sie setzt sich aus den Clearanceanteilen der jeweils an der Elimination beteiligten Organe oder Enzyme zusammen.

2.4.2 Analyse der Messdaten

Die Ergebnisse der Plasmakonzentrationsmessungen wurden durch nonparametrische pharmakokinetische Methoden analysiert mittels des Programms WinNonlin™ Version 1,5., 1997 (Scientific Consulting Inc., NC, USA). Die AUCs wurden nach der Trapezregel mit Extrapolierung gegen unendlich bestimmt und die Cl_o nach oben beschriebener Formel aus der oralen Dosis und den AUCs berechnet. Die orale Clearance errechnet sich somit als der Quotient aus der Clearance und der Bioverfügbarkeit. Die AUCs für N-Desmethyldoxepin wurden nicht gegen unendlich extrapoliert, da die Schätzung der für die AUC-Berechnung erforderlichen Eliminationskonstante aufgrund der zu langen Eliminationszeiten des Metaboliten zu ungenau gewesen wäre. Die AUCs für N-Desmethyltrimipramin wurden ebenfalls nicht gegen unendlich extrapoliert, da zu viele Plasmaproben unter der Bestimmungsgrenze lagen. Die Gesamt-AUCs der aktiven Substanzen Doxepin und N-Desmethyldoxepin bzw. Trimipramin und N-Desmethyltrimipramin wurden durch Addition der einzelnen AUCs berechnet. Als die jeweilige C_{\max} wurde die höchste gemessene Plasmakonzentration einer einzelnen Kinetik gewertet. Bei der enantioselektiven Analyse von

Doxepin wurde die orale Dosis der Zis- und Trans-Isomere aufgrund deren Mischungsverhältnisses mit 0,15 bzw. 0,85 der Doxepindosis errechnet.

2.4.3 Statistik

Zur Feststellung signifikanter Unterschiede hinsichtlich pharmakokinetischer Eigenschaften in Bezug auf die einzelnen Genotypen wurde der Trendtest nach Jonckheere-Terpstra verwendet. Die Reihenfolge zur statistischen Testung von AUC, C_{\max} und der Halbwertszeit $t_{1/2}$ wurde entsprechend der Anzahl aktiver Allele wie folgt festgelegt: CYP2D6: PM > IM > EM > UM; CYP2C9: *3/*3 > *1/*1; CYP2C19: *2/*2 > *2/*1 > *1/*1. Zur Testung der Clearance wurde entsprechend die umgekehrte Reihenfolge zugrunde gelegt. Statistische Berechnungen und Grafiken wurden mit der Software SPSS, Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und S-Plus 2000 (Math Soft Inc., Cambridge, MA, USA) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse für Doxepin

Insgesamt nahmen 42 gesunde männliche und weibliche Probanden jeweils 75 mg Doxepin oral ein. Es wurden 546 Blutproben entnommen und die Plasmakonzentrationen beider Isomere von Doxepin sowie des Metaboliten N-Desmethyldoxepin bestimmt. Die Plasmaspiegel von Doxepin und N-Desmethyldoxepin lagen in 431 bzw. 409 Fällen über der Bestimmungsgrenze.

3.1.1 Pharmakokinetik von Doxepin und N-Desmethyldoxepin in Abhängigkeit vom Genotyp

Tabelle 11 zeigt die individuellen Daten für die pharmakokinetischen Parameter Cl/F (Orale Clearance: Clearance / bioverfügbare Fraktion eines Medikaments), C_{max} (maximale Konzentration), $t_{1/2}$ (Halbwertszeit) von Doxepin bzw. AUC (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt der Medikamentenverabreichung bis zur Konzentration der 48 h nach Medikation erhaltenen Plasmaprobe), C_{max} und $t_{1/2}$ von N-Desmethyldoxepin. Wie in der Einleitung erläutert wurde, korreliert der klinische Effekt von Doxepin besser mit der Summe der Plasmaspiegel von Doxepin und N-Desmethyldoxepin als mit der Doxepinkonzentration allein, weswegen die Gesamt-AUC als Summe der Einzel-AUCs ebenfalls angegeben ist.

Die Gruppe der CYP2D6-Langsammetabolisierer wies die niedrigste orale Clearance mit einem Median von 1,4 l/(h · kg) (Konfidenzintervall 0,7 – 2,7) auf im Vergleich zu 6,2 l/(h · kg) (3,9 – 20,8) in der Gruppe der CYP2D6-Schnellmetabolisierer. Somit variierten die durchschnittlichen Doxepin-Clearances etwa 4-fach zwischen Trägern zweier aktiver und zweier inaktiver CYP2D6-Gene. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl aktiver Allele für CYP2D6 und einem Anstieg der Doxepin-Clearance konnte mithilfe des Jonckheere-Terpstra Trendtests hochsignifikant nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Die Doxepin-Spitzenkonzentration C_{max} sowie die terminale Halbwertszeit $t_{1/2}$ waren in der Gruppe der CYP2D6-PMs mit 104 nmol/l (43 – 332) bzw. 26h (14 – 37) im Vergleich zur Referenzgruppe mit $p = 0,028$ bzw. $p < 0,001$ signifikant erhöht. Die terminale Halbwertszeit wurde hierbei aus den Plasmaspiegelkonzentrationen der letzten 6 Blutentnahmen mittels linearer Regression berechnet.

Bei Probanden, die zu den CYP2C9*3/*3- und CYP2C19*2/*2-Gruppen gehörten, wurden mit 3,5 l/(h · kg) bzw. 2,8 l/(h · kg) ebenfalls signifikant erniedrigte orale Clearances gemessen ($p = 0,017$ bzw. $p = 0,009$, siehe *Tabelle 11*). Der Anstieg der terminalen Halbwertszeiten in diesen Gruppen war jedoch nur unwesentlich.

Die nonparametrische Analyse für N-Desmethyldoxepin wies ebenfalls einen Einfluss des CYP2D6-Genotyps auf die Pharmakokinetik des Metaboliten nach. CYP2D6-PMs besaßen mit einem Median für die AUC_{0-48h} von 5,28 $\mu\text{mol/l}$ (2,62 – 21,66) das 4-fache, mit einer C_{max} von 45 nmol/l (29 – 87) das Doppelte und einer $t_{1/2}$ von 79 h (50 – 172) das 3-fache der Werte der Vergleichsgruppe. Die pharmakokinetischen Daten der heterozygoten Träger eines defizienten CYP2D6-Allels lagen zwischen denen der CYP2D6-PMs und –EMs, was einen linearen Gen-Dosis-Effekt nahe legt. Träger eines CYP2C9- oder CYP2C19-Polymorphismus unterschieden sich bezüglich der Plasmakonzentration von N-Desmethyldoxepin nicht signifikant von der Referenzgruppe (siehe *Tabelle 11*). Die einzelnen AUCs von N-Desmethyldoxepin für den Zeitraum von 0 – 48 h nach Medikation geordnet nach Genotyp-Gruppen sind in *Abbildung 7* veranschaulicht.

Tabelle 11: Pharmakokinetische Daten für Doxepin und N-Desmethyldoxepin nach Genotypen geordnet (Mediane mit Konfidenzintervall in Klammern)

Gruppen	E, Z-Doxepin			E, Z-N-Desmethyldoxepin			Gesamt-AUC**
	Cl/F/KG [l/(h · kg)]	C_{max} [nmol/l]	$t_{1/2}$ [h]	AUC_{0-48h} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$]	C_{max} [nmol/l]	$t_{1/2}$ [h]	AUC [$\mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$]
Referenzgruppe	6,2 (3,9–0,8)	50 (12–96)	13 (5–23)	1,28 (0,81–1,63)	26 (20–40)	27 (16–45)	1,43 (0,95–1,97)
CYP2D6 Genotyp							
IM, 1 aktives Gen	3,6 (1,5–7,4)	84 (27–121)	17 (8–20)	1,35 (0,81–8,23)	31 (17–41)	45 (29–283)	1,70 (0,88–3,36)
PM, 0 aktives Gen	1,4 (0,7–2,7)	104 (43–332)	26 (14–37)	5,28 (2,62–21,66)	45 (29–87)	79 (50–172)	4,15 (2,49–8,87)
Differenz*	$p < 0,017$	$p = 0,028$	$p < 0,001$	$p = 0,002$	$p = 0,008$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
CYP2C9-Genotyp							
CYP2C9*3/*3	3,5 (2,6–4,2)	88 (60–116)	17 (13–38)	1,37 (1,06–2,06)	28 (22–35)	27 (20–43)	1,88 (0,98–3,52)
Differenz	$p = 0,017$	$p = 0,028$	NS***	NS	NS	NS	$p = 0,042$
CYP2C19-Genotyp							
IM, 1 aktives Gen	5,4 (1,4–8,4)	59 (32–223)	11 (9–14)	1,32 (0,64–4,10)	24 (18–53)	38 (7–168)	1,28 (0,90–3,89)
PM, 0 aktives Gen	2,8 (1,8–5,6)	84 (12–188)	13 (8–23)	0,78 (0,42–1,22)	18 (12–41)	34 (24–49)	1,43 (0,98–3,52)
Differenz*	$p = 0,009$	NS	NS	NS	NS	NS	NS

* Signifikanz der Differenz verglichen mit der Referenzgruppe (Wildtypallele für alle 3 Enzyme). Die Signifikanz wurde für die Enzyme CYP2D6 und CYP2C19 mittels des Trendtests nach Jonckheere-Terpstra berechnet und für CYP2C19*3/*3 mithilfe des U-Tests von Mann-Whitney. ** Die Gesamt-AUC wurde als Summe der $AUC_{0-\infty}$ von E-,Z-Doxepin + AUC_{0-48h} von N-Desmethyldoxepin berechnet. *** Nicht signifikant

Eine abschließende Analyse der Summe beider Einzel-AUCs von Doxepin und N-Desmethyldoxepin ergab auch hier einen hoch signifikanten Einfluss des CYP2D6-Genotyps ($p < 0,001$), sowie einen gering bzw. nicht signifikanten Einfluss des CYP2C9- bzw. CYP2C19-Genotyps auf diesen klinisch relevanten Parameter (siehe *Tabelle 11*).

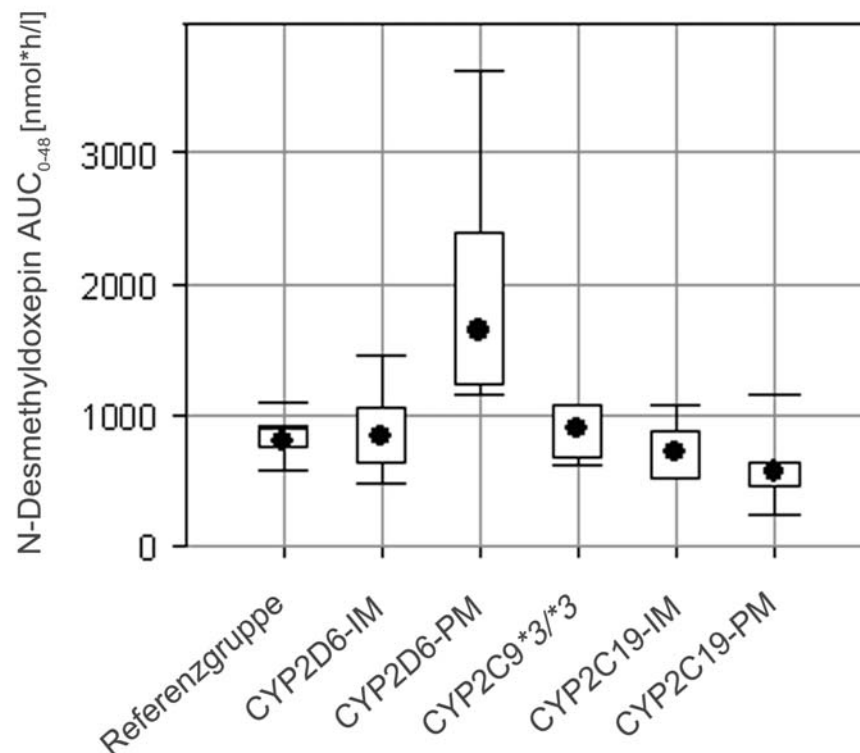


Abbildung 7: AUCs_{0-48h} von N-Desmethyldoxepin in Bezug auf die untersuchten Genotypen der Cytochrom-Enzyme

3.1.2 Pharmakokinetik der E- und Z-Isomere von Doxepin in Abhängigkeit vom Genotyp

Die pharmakokinetischen Parameter Cl/F und $t_{1/2}$ der stereospezifischen Analyse von Doxepin werden in *Tabelle 12* dargestellt. Die durchschnittlichen Clearances von E-Doxepin in der CYP2D6-Gruppe betrugen 406 l/h für die Referenzgruppe, 247 l/h für Träger eines defekten Gens und 127 l/h für Träger zweier defekter Gene. Die 95%-Konfidenzintervalle lagen entsprechend bei 390 – 445 l/h, 241 – 271 l/h bzw. 124 – 139 l/h. Somit konnte ein starker Einfluss des CYP2D6-Genotyps auf die

Clearance und die Eliminationshalbwertszeit von E-Doxepin nachgewiesen werden, was in *Abbildung 8* nochmals verdeutlicht wird.

Auf die Pharmakokinetik des Z-Isomers von Doxepin besaß der CYP2D6-Genotyp einen entgegengesetzten Einfluss. Der in *Abbildung 8* offensichtliche Anstieg der Clearance bei CYP2D6-IMs wurde statistisch signifikant bestätigt durch eine Abnahme der objektiven Funktion um 9 und einer LR von 0,003. Zusätzlich wiesen homozygote Träger des CYP2C19-Polymorphismus niedrigere Z-Doxepin-Clearances auf. Dieser Effekt scheint deutlich in *Abbildung 8*, erwies sich in statistischen Analysen jedoch als nur gering signifikant ($p = 0,06$), was möglicherweise bedingt ist durch die große Streuung der Messungen in dieser Gruppe.

Tabelle 12: Pharmakokinetische Daten der E- und Z-Isomere von Doxepin nach Genotypen geordnet

Gruppe	E-Doxepin		Z-Doxepin	
	CI/F [l/h]*	Terminale $t_{1/2}$ [h]	CI/F [l/h]	Terminale $t_{1/2}$ [h]
Referenzgruppe	406	6,58	191	7,51
	390 – 445		178 – 203	
CYP2D6-IM	247	8,20	264	6,46
	241 – 271		247 – 280	
CYP2D6-PM	127	11,1	196	7,41
	124 – 139		183 – 209	
CYP2C9*3/*3	238	8,34	139	8,72
	232 – 261		129 – 148	
CYP2C19-IM (*1/*2)	371	6,85	125	9,17
	361 – 407		116 – 133	
CYP2C19-PM (*2/*2)	337	7,14	73	11,9
	328 – 370		67 – 78	

* Daten werden als Durschnittswerte der einzelnen Gruppen mit einem 95%-Konfidenzintervall dargestellt. Kein Konfidenzintervall ist für die terminale Halbwertszeit angegeben, da sie ein sekundärer pharmakokinetischer Parameter ist.

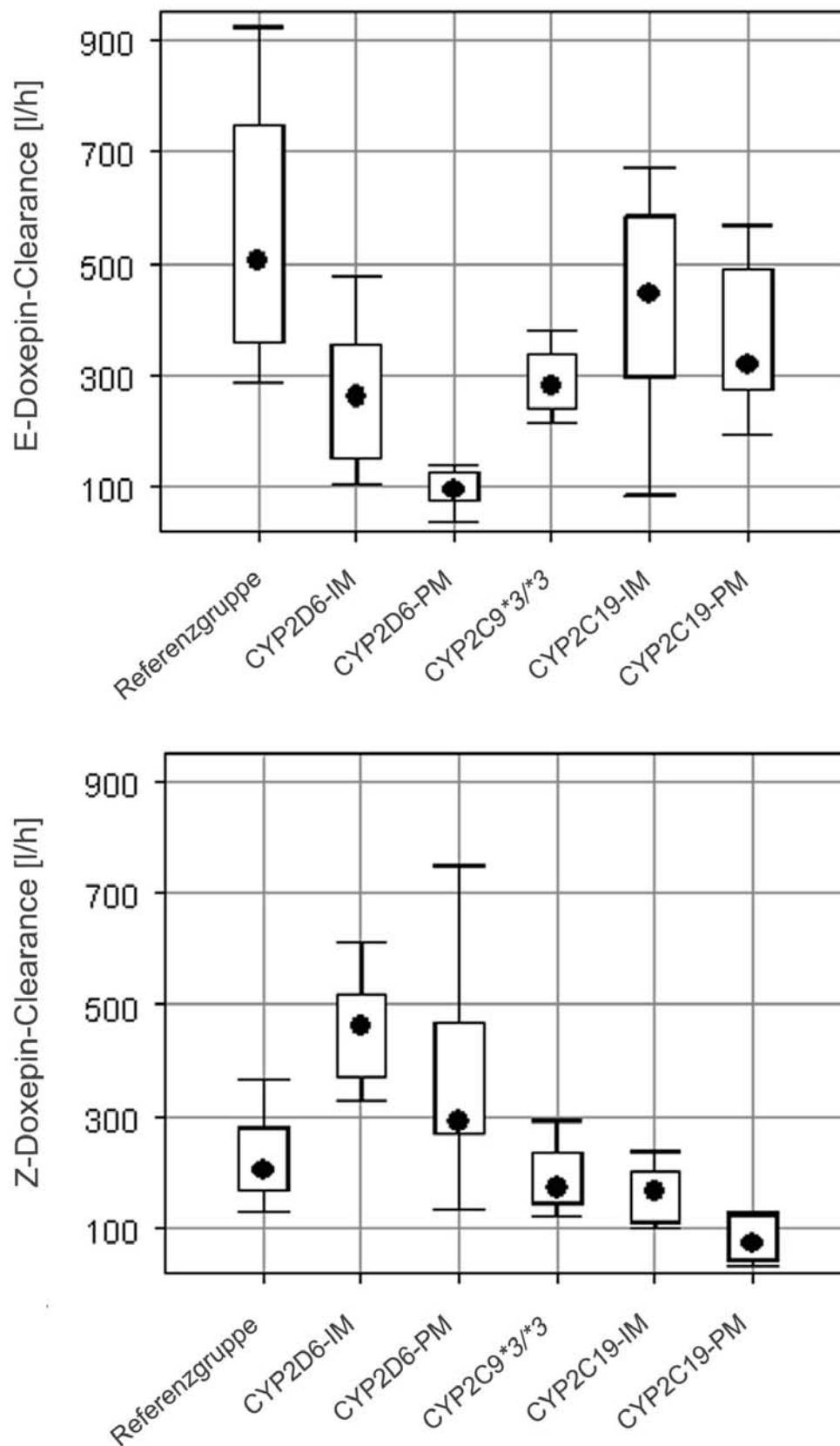


Abbildung 8: Orale Clearances von E- und Z-Doxepin in Abhängigkeit vom CYP2D6-, CYP2C9- und CYP2C19-Genotyp)

3.2 Ergebnisse für Trimipramin

Insgesamt nahmen 42 gesunde männliche und weibliche Probanden an der pharmakokinetischen Studie teil. Nach oraler Gabe von 75 mg razemischen Trimipramins wurden insgesamt 546 Blutproben erhalten und die Plasmakonzentrationen von Trimipramin und N-Desmethyltrimipramin gemessen.

3.2.1 Pharmakokinetik von Trimipramin in Abhängigkeit vom Genotyp

Der Plasmaspiegel von Trimipramin lag bei 464 gewonnenen Blutproben über der Bestimmungsgrenze. *Tabelle 13* zeigt die individuellen Daten für die pharmakokinetischen Parameter Cl/F , $AUC_{0-\infty}$, C_{max} und $t_{1/2}$ für Trimipramin. Die Gruppen der Langsam- und Intermediärmetabolisierer für CYP2D6 wiesen die niedrigsten oralen Clearances auf mit einem Median von 36 l/h (Konfidenzintervall 24 – 48) bzw. 114 l/h (48 – 240) im Vergleich zur Referenzgruppe mit einer oralen Clearance von 276 l/h (180 – 444). Einen Überblick über die nach Genotyp geordneten oralen Trimipraminclearances gibt *Abbildung 9*. In der Gruppe der CYP2D6-PMs waren C_{max} mit 92,1 µg/l (55,7 – 135,6) um das 4-fache, $t_{1/2}$ mit 31 h (21,9 – 72,4) um das Doppelte und die AUCs mit 2,13 mg/(l · kg) (1,52 – 3,27) um das mehr als 7-fache im Vergleich zur Gruppe der Schnellmetabolisierer erhöht. *Abbildung 10* verdeutlicht, dass die AUCs von Trimipramin bei heterozygoten Trägern eines defizienten CYP2D6-Allels zwischen denen der CYP2D6-PMs und der –EMs lagen. Mithilfe des Jonckheere-Terpstra Trendtests konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl aktiver CYP2D6-Gene und der AUC nachgewiesen werden ($p < 0,001$), was die tragende Rolle dieses Isoenzym bei Metabolismus von Trimipramin verdeutlicht.

In den Gruppen der CYP2C19-IMs und –PMs wurden orale Clearances von 132 l/h (30 – 456) bzw. 138 l/h (78 – 228) gemessen, was einen signifikanten Einfluss ($p = 0,01$) des CYP2C19-Genotyps auf die Trimipramin-Demethylierung belegt. Außerordentlich hohe Trimipraminkonzentrationen wurden bei jeweils einem Probanden aus der CYP2C19-IM- bzw. –PM-Gruppe bestimmt. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Begründung für diese extremen Abweichungen, da die Kinetikstudie bei den zwei Personen nicht wiederholt werden konnte.

Homozygote Träger des CYP2C9-Polymorphismus wiesen mit einem Median von 162 l/h (114 – 306) ebenfalls verminderte Trimipraminclearances auf, was auf eine

Beteiligung dieses Isoenzym an der Trimipramin-Demethylierung hindeutet, jedoch statistisch nicht signifikant war.

Tabelle 13: nonparametrische pharmakokinetische und statistische Analyse von Trimipramin, nach Genotypen geordnet

Gruppe	Trimipramin, Median (Konfidenzintervall)			
	Cl/F [l/h]	AUC [mg/(l x h)]	Cmax [µg/l]	t _{1/2} [h]
Referenzgruppe	276 (180 – 444)	0,28 (0,17 – 0,42)	22,4 (14,6 – 41,7)	14,9 (9,3 – 28,4)
CYP2D6 Genotyp				
IM, 1 aktives Gen	114 (48 – 240)	0,70 (0,31 – 1,54)	62,5 (21,4 – 88,4)	32,0 (10,7 – 44,8)
PM, 0 aktives Gen	36 (24 – 48)	2,13 (1,52 – 3,27)	92,1 (55,7-135,6)	31 (21,9 – 72,4)
2D6 Differenz*	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P = 0,005
CYP2C19 Genotyp				
IM, 1 aktives Gen	132 (30 – 456)	0,57 (0,17 – 2,43)	36,3 (11,2 – 89,5)	46,3 (14,1-337,6)
PM, 0 aktives Gen	138 (78 – 228)	0,54 (0,33 – 0,94)	40,5 (26,4-215,9)	32,3 (19,9 – 86,7)
Differenz*	P = 0,01	P = 0,01	P = 0,058	P = 0,012
CYP2C9 Genotyp				
CYP2C9*3/*3	162 (114 – 306)	0,50 (0,24 – 0,65)	43,2 (15,6 – 63,7)	33,6 (17,3-148,0)
Differenz*	NS	NS	NS	P = 0,03

*Signifikanz der Differenz zwischen den gemessenen Werten der Genotypgruppe und der Referenzgruppe (Wildtypallel für alle 3 Enzyme). Die Signifikanz wurde berechnet mittels des Jonckheere-Terpstra-Trendtests für CYP2D6 und CYP2C19 und des U-Tests von Mann-Whitney für CYP2C9.

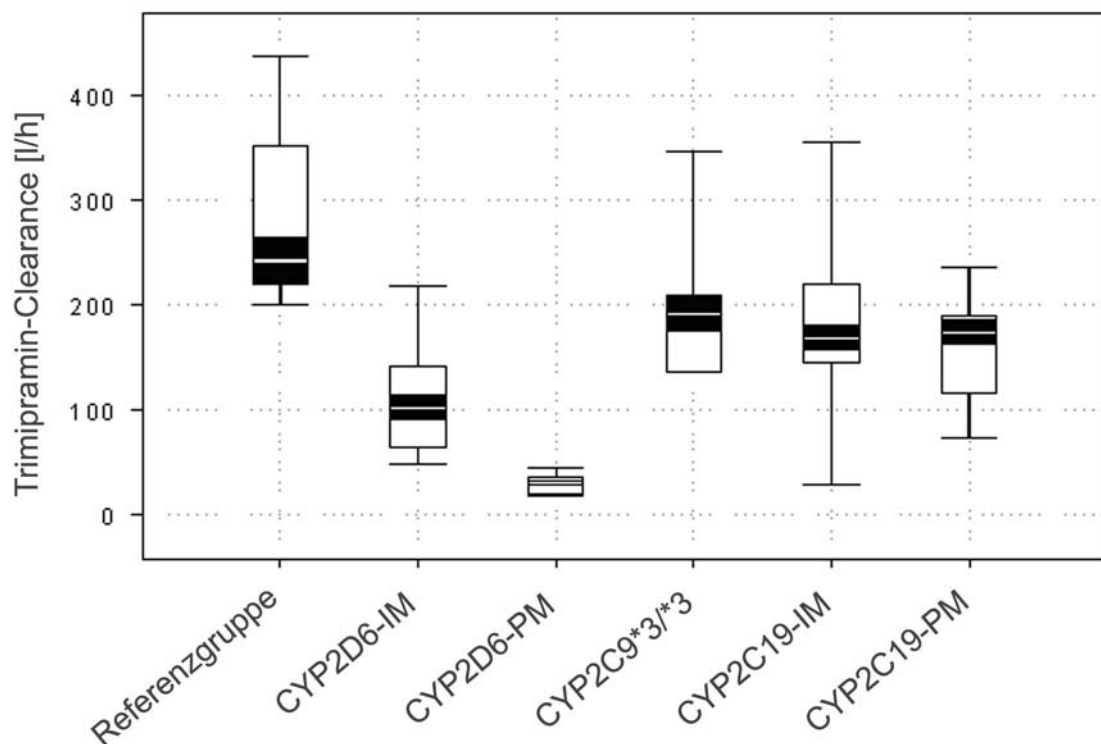


Abbildung 9: Individuelle orale Clearances von Trimipramin, geordnet nach dem CYP-Genotyp.

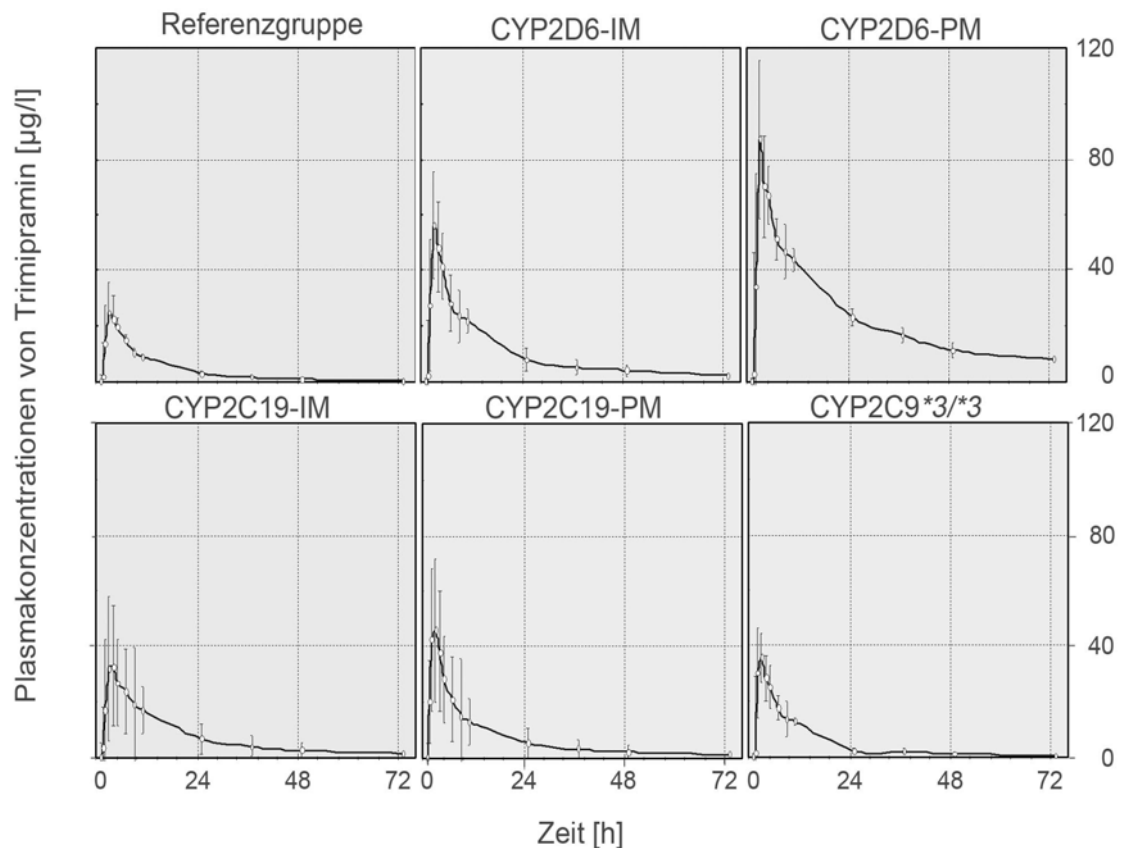


Abbildung 10: Aus den Mittelwerten berechnete Zeit-Konzentrations-Kurven von Trimipramin, nach dem CYP-Genotyp geordnet. Als Y-Fehlerindikator ist die Standardabweichung eingezeichnet.

3.2.2 Pharmakokinetik von N-Desmethyltrimipramin in Abhängigkeit vom Genotyp

Nur in 252 Fällen lagen die gemessenen Plasmakonzentrationen über der Bestimmungsgrenze, weswegen für N-Desmethyltrimipramin die AUCs nicht gegen unendlich extrapoliert werden konnten. *Abbildung 11* zeigt die Desmethyltrimipraminspiegel der Probanden geordnet nach dem Genotyp. Die Anzahl der Blutproben mit Medikamentenspiegel unter der Nachweisbarkeitsgrenze war bei Trägern des CYP2C9-Genotyps *3/*3 (73 % aller Proben) und bei CYP2C19-PMs (86 % aller Proben) signifikant erhöht im Vergleich zur Referenzgruppe, was mithilfe des Exakten Fisher-Tests nachgewiesen wurde ($p < 0,001$). Bei zwei Probanden aus der CYP2C19*2/*2-Gruppe waren überhaupt keine Desmethyltrimipraminspiegel quantifizierbar.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die nonparametrische pharmakokinetische Analyse von Desmethyltrimipramin. Die AUCs waren mit 1,7 mg/(l · h) (1,1 – 2,2)

bzw. 0,14 mg/(l · h) (0,01 – 0,9) in den Gruppen der CYP2D6-PMs und -IMs um das 40-fache bzw. 3-fache erhöht im Vergleich zur Referenzgruppe, die eine AUC von 0,04 mg/(l · h) (0,005 – 0,008) aufwies. Entsprechend wurden in der Gruppe der CYP2D6-PMs und -IMs mit 29,3 µg/l (18 – 41) bzw. 6,6 µg/l (2,3 – 19) Maximalkonzentrationen C_{\max} gemessen, die um das 10- bzw. 2-fache erhöht waren im Vergleich zum Median der Vergleichsgruppe, der bei 2,8 µg/l (1,8 – 5,7) lag. CYP2D6 scheint *in vivo* das wichtigste Enzym des Desmethyltrimipraminmetabolismus zu sein, was durch einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl aktiver CYP2D6-Allele und einem Anstieg der AUC im Jonckheere-Terpstra Trendtest bestätigt wurde ($p < 0,001$).

Die Mehrheit der Desmethyltrimipraminkonzentrationen der CYP2C19-PMs lag unter der Bestimmungsgrenze und der Median ihrer AUCs betrug mit 0,006 mg/(l · h) (0 – 0,01) nur etwa ein Siebtel der AUCs der Referenzgruppe. In der Gruppe der CYP2C9-PMs wurden mit 0,007 mg/(l · h) erniedrigte AUCs des Metaboliten berechnet, die jedoch statistisch nicht signifikant waren und nur auf einen geringen Einfluss dieses Enzyms auf die Demethylierung von Trimipramin hindeuten.

Tabelle 14: Nonparametrische pharmakokinetische und statistische Analyse von N-Desmethyltrimipramin sowie die Summe beider aktiver Substanzen nach Genotypen geordnet

Gruppe	Desmethyltrimipramin, Median (Konfidenzintervall)		Trimipramin und Desmethyltrimipramin, Median (Konfidenzintervall)	
	AUC [mg/(l x h)]	C_{\max} [µg/l]	C_{\max} [µg/l]	AUC [mg/(l x h)]
Referenzgruppe	0,04 (0,005 – 0,008)	2,8 (1,8 – 5,7)	26 (16 – 47)	0,32 (0,19 – 0,49)
CYP2D6 Genotyp				
IM, 1 aktives Gen	0,14 (0,01 – 0,9)	6,6 (2,3 – 19)	70 (27 – 108)	0,80 (0,43 – 2,5)
PM, 0 aktives Gen	1,7 (1,1 – 2,2)	29,3 (18 – 41)	121 (76 – 171)	3,7 (3,1 – 4,8)
Differenz	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,001$	$p < 0,001$
CYP2C19 Genotyp				
IM, 1 aktives Gen	0,04 (0,01 – 0,04)	3,0 (3 – 16)	43 (14 – 96)	0,67 (0,20 – 2,8)
PM, 0 aktives Gen*	0,006 (0 – 0,01)	2,0 (1 – 7)	47 (28 – 87)	0,55 (0,33 – 0,94)
Differenz	$p = 0,01$	NS	NS	0,02
CYP2C9*3/*3	0,007 (0,004 – 0,03)	2,5 (1,3 – 2,9)	45 (19 – 66)	0,52 (0,25 – 0,66)
Differenz	NS	NS	NS	NS

*Bei zwei Trägern des CYP2C19-Genotyps *2/*2 lagen sämtliche Desmethyltrimipraminkonzentrationen unter der Bestimmungsgrenze.

In *Tabelle 14* ist zusätzlich die für die Klinik wichtige Summe der maximalen Konzentrationen C_{\max} und der AUCs beider pharmakologisch aktiven Substanzen Trimipramin und N-Desmethyltrimipramin dargestellt. Auffallend ist der hochsignifikante Unterschied der AUCs ($p < 0,001$) und C_{\max} ($p = 0,001$) in der Gruppe der CYP2D6-Langsammetabolisierer im Vergleich zur Referenzgruppe. Im Gegensatz hierzu weist

der Median der Summe der Trimipramin- und Desmethyltrimipramin-AUCs in der Gruppe der CYP2C19-PMs nur eine gering signifikante Differenz zum Wildtyp auf ($p = 0,02$), während die Summe von C_{\max} keine signifikante Abhängigkeit vom CYP2C19-Genotyp besaß.

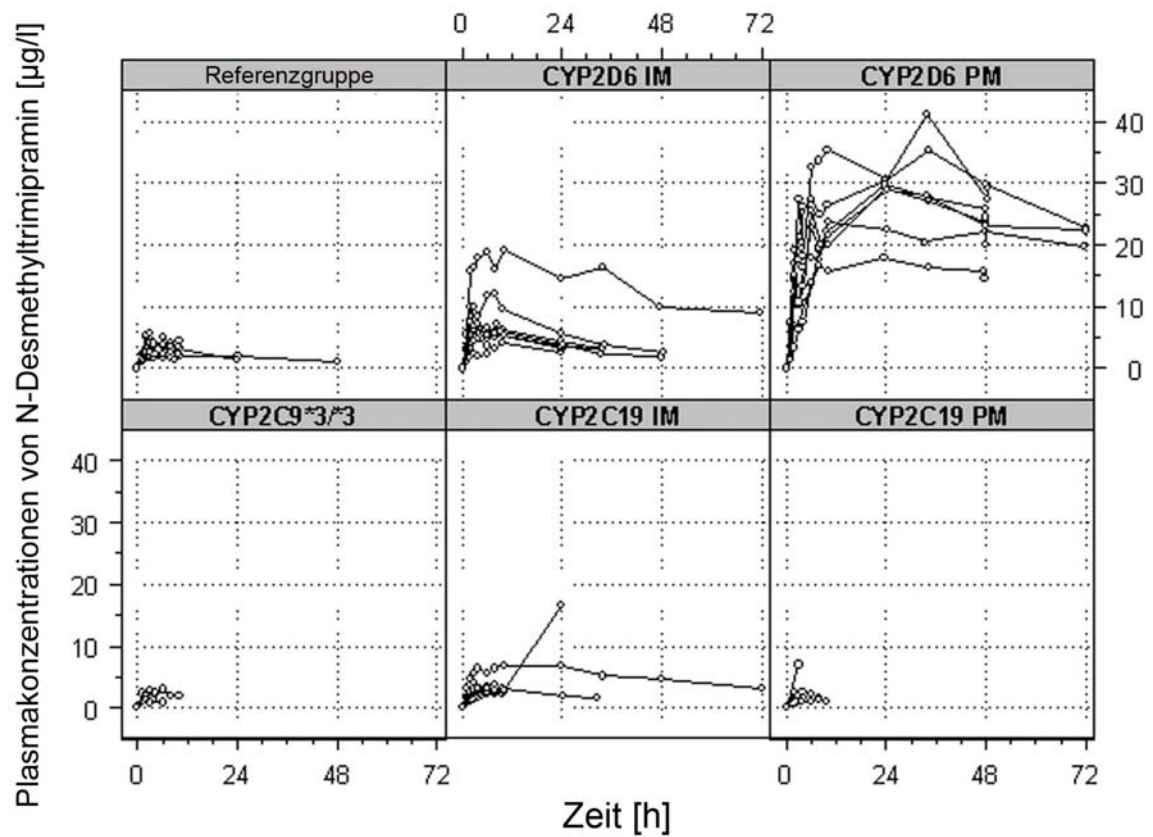


Abbildung 10: Konzentrations-Zeit-Kurven von N-Desmethyltrimipramin, geordnet nach dem CYP-Genotyp

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Doxepinergebnisse

4.1.1 Auswirkungen des CYP2D6-Polymorphismus auf den Metabolismus von Doxepin

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen bedeutenden Einfluss des CYP2D6-Polymorphismus auf den Metabolismus von Doxepin und N-Desmethyldoxepin *in vivo*. Langsammetabolisierer dieses Isoenzym wiesen sowohl für Doxepin als auch seinen Metaboliten eine 3- bis 4-fach erhöhte AUC auf im Vergleich zur Referenzgruppe und die oralen Clearances nahmen signifikant zu mit der Anzahl der aktiven CYP2D6-Allele.

Eine gesonderte Betrachtung der einzelnen Isomere zeigte, dass dieser Effekt ausschließlich auf das E-Isomer von Doxepin beschränkt ist, was auf eine Stereoselektivität des Enzyms hinsichtlich dieses Isomers hindeutet. Im Gegensatz hierzu scheint die Clearance des Z-Isomers in der Gruppe der heterozygoten IMs bezüglich CYP2D6 sogar anzusteigen (siehe *Abbildung 8*). Dies ließe sich beispielsweise erklären durch eine allosterische Aktivierung oder durch Induktion des Z-Doxepin metabolisierenden Enzyms durch den hohen E-Doxepinplasmaspiegel. Solange dieses Ergebnis nicht durch weitere Studien bestätigt wird, werten wir es dennoch als eine zufällige Schwankung beziehungsweise als Folge von bisher unbekannten Einflussfaktoren. Diesbezüglich konnten wir jedoch Hauptfehlerquellen wie Alter, Körpergewicht, Wechselwirkungen mit Medikamenten oder Nahrungsbestandteilen ausschließen.

4.1.2 Auswirkungen der CYP2C19- und CYP2C9-Polymorphismen auf den Metabolismus von Doxepin

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass das Enzym CYP2C19 einen signifikanten Einfluss auf die Clearance von Doxepin, aber nicht von N-Desmethyldoxepin ausübt. Die stereospezifische Analyse wies nach, dass dieser Effekt bedingt ist durch die mehr als doppelt so hohe Clearance des Z-Isomers in der Gruppe der CYP2C19-PMs im Vergleich zur Referenzgruppe. Träger zweier inaktiver CYP2C19-Allele wiesen auch die höchste terminale Halbwertszeit von Z-Doxepin auf und die

niedrigsten AUCs von N-Desmethyldoxepin. Somit ist dieser Genotyp signifikant an der Bildung des Doxepinmetaboliten beteiligt. Dennoch scheint die für die klinische Praxis wichtige Gesamt-AUC von Doxepin und N-Desmethyldoxepin unabhängig vom CYP2C19-Genotyp zu sein. Auffällig ist die stereospezifische Affinität von CYP2C19 zu Z-Doxepin im Gegensatz zu CYP2D6, das eine stärkere Aktivität in Bezug auf das E-Isomer aufwies. Es wäre eine ergänzende Studie mit Trägern zweier inaktiver Allele für jedes dieser beiden Enzyme als kombinierte Langsammetabolisierer interessant, die Prävalenz dieses seltenen Genotyps beträgt jedoch bei Kaukasern nur 0,2 %.

Das Enzym CYP2C9 weist in Bezug auf den Metabolismus von Doxepin Gemeinsamkeiten mit CYP2C19 auf. Der Einfluss scheint ebenfalls statistisch signifikant, aber auch vergleichsweise gering zu sein. CYP2C9 katalysiert stereospezifisch mit Präferenz des E-Isomers von Doxepin, wohingegen der Metabolismus von N-Desmethyldoxepin offenbar unabhängig vom Genotyp dieses Enzyms ist. Für die Studie wählten wir homozygote Träger des CYP2C9*3-Allels aus, welche mit einer Frequenz von etwa 0,5 – 1 % in der kaukasischen Population vorkommen. Aus Studien mit Substraten von CYP2C9 ist bekannt, dass Träger des Genotyps CYP2C9*3/*3 die niedrigste Clearance im Vergleich zu den anderen Genotypen, die sich durch die Allele CYP2C9*2 und CYP2C9*3 ergeben, besitzen. Für weitere Allele von CYP2C9, beispielsweise das einmal nachgewiesene Allel CYP2C9*6 (Kidd et al., 2001), welches komplett inaktiv ist, gibt es bislang keine klinischen Studien. In der vorliegenden Studie war in der Gruppe dieses seltenen Genotyps *3/*3 der Median der Clearances von E-Doxepin nur um etwa 50 % im Vergleich zur Referenzgruppe reduziert. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass für die psychiatrische Praxis die Auswirkung des CYP2C9-Polymorphismus auf die Doxepinmedikation zu vernachlässigen ist.

4.1.3 Vergleich der gefundenen Daten mit anderen In-vivo- und In-vitro-Studien

Trizyklische Antidepressiva weisen aufgrund ihrer engen strukturellen Verwandtschaft viele pharmakokinetische Gemeinsamkeiten auf. In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Hauptabbauewege in der N-Demethylierung sowie der Hydroxylierung der Muttersubstanz zu sehen sind, wobei CYP2D6 vorrangig die Hydroxylierung katalysiert, während an der N-Demethylierung mehrere Enzyme wie CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 und CYP2C19 beteiligt sind (Mellström et

al., 1986; Mellström et al., 1981; Kramer Nielsen et al., 1992; Madsen et al., 1995). Doxepin scheint einige pharmakokinetische Parallelen zu anderen trizyklischen Antidepressiva aufzuweisen.

Eine kürzlich erschienene *In-vitro*-Studie (Haritos et al., 2000) wies nach, dass CYP2D6 das vorrangige oxidierende Enzym im Doxepinmetabolismus ist, indem es allein die Hydroxylierung katalysiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Enzyme CYP2D6 und CYP2C9 nur geringfügig an der N-Demethylierung beteiligt sind. Dieser Schritt schien überwiegend durch die Enzyme CYP3A4 und CYP1A2 katalysiert zu werden, womit eine frühere Veröffentlichung bestätigt wurde, die bei Rauchern durch Induktion von CYP1A2 eine höhere Doxepinclearance nachwies als bei Nichtrauchern (Ereshefsky et al., 1988). Eine Studie aus dem Jahr 2002 schlug weiterhin noch CYP2C19 als wichtiges N-demethylierendes Enzym des Doxepinmetabolismus neben CYP2C9 und CYP1A2 vor (Härtter et al., 2002). Unsere Beobachtungen sind mit den Ergebnissen dieser Studien zu vereinbaren. Insbesondere die klinische Relevanz des polymorphen Isoenzym CYP2D6 konnte bestätigt werden, sowie die signifikante jedoch geringere Beteiligung von CYP2C9 und CYP2C19. Aus *Abbildung 7* ist anschaulich zu entnehmen, dass sowohl bei Trägern zweier defizienter Allele für CYP2C19 sowie CYP2C9 N-Desmethyldoxepin gebildet wird und folglich diese zwei Enzyme *in vivo* nicht die einzigen Demethylasen von Doxepin sein können. Dennoch lagen die Konzentrationen von N-Desmethyldoxepin in der Gruppe der CYP2C19-PMs in der Tat unter denen der Referenzgruppe (*Abbildung 7*).

Es ist schon lange bekannt, dass für das Verständnis der Pharmakokinetik wie der Pharmakodynamik von Doxepin die stereospezifische Analyse unerlässlich ist. Schon vor über 20 Jahren wurde das erste Mal eine Anreicherung des Zis-Isomers von N-Desmethyldoxepin *in vivo* beobachtet (Bogaert et al., 1981) und in der Folge durch mehrere Studien bestätigt (Hrdina et al., 1990; Adamczyk et al., 1995; Deuschle et al., 1997). Da Z-Doxepin stärkere antidepressive Eigenschaften besitzt als E-Doxepin (Pinder, 1977), und N-Desmethyldoxepin teilweise pharmakologisch aktiver ist als die Muttersubstanz, sind die Mechanismen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, von besonderem Interesse. *Haritos et al.* wiesen *in vitro* nach, dass CYP2D6 ausschließlich die E-Isomere von Doxepin und N-Desmethyldoxepin stereospezifisch hydroxyliert, während das Z-Isomer nur durch die stereounspezifische N-Demethylierung abgebaut wird. Dies wird weiterhin dadurch bestätigt, dass sowohl in dieser wie auch in einer *In-vivo*-Studie aus dem Jahr 1990 kein hydroxyliertes Z-Do-

xepin nachgewiesen werden konnte (Shu et al., 1990). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Z-N-Desmethyldoxepin möglicherweise ein Endprodukt im Doxepin-metabolismus ist und so relativ zum E-Isomer in größerer Menge vorliegt, da E-Desmethyldoxepin nach Hydroxylierung schneller über die Niere ausgeschieden werden kann (siehe *Abbildung 2*). Eine weitere Erklärung für die Anreicherung von Z-N-Desmethyldoxepin lieferten *Ghabrial et al.*, indem sie eine Isomerisierung vom E-Isomer zum Z-Isomer während der N-Desmethylierung *in vivo* nachwiesen (Ghabrial et al., 1991). Die vorliegende Studie bestätigt eindeutig, dass CYP2D6 stereoselektiv den Abbau von E-Doxepin katalysiert, während der Metabolismus des Z-Isomers von diesem Genotyp unabhängig ist. Die Gruppe der CYP2D6-PMs wies wie in oben erwähnten Studien deutlich höhere N-Desmethyldoxepinkonzentrationen auf als die anderen Gruppen. Wir interpretieren dies als die Folge einer beeinträchtigten Eliminierung von N-Desmethyldoxepin, was zu dessen Anreicherung führt. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass bei einer früheren Single-dose-Studie mit Doxepin 2 von 30 Probanden (6,7 %) eine ungewöhnlich hohe AUC für E-N-Desmethyldoxepin und keine Anreicherung von Z-N-Desmethyldoxepin gemessen wurde (Midha et al., 1992). Eine ähnliche Beobachtung wurde während einer weiteren Studie bei 11 % der Studienteilnehmer beschrieben (Adamczyk et al., 1995). Es könnte sein, dass diese unerwarteten Ergebnisse im Zusammenhang mit dem CYP2D6-Polymorphismus stehen, der bei 5 – 10 % der kaukasischen Bevölkerung zu finden ist, und rückblickend die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen.

4.2 Diskussion der Trimipraminergebnisse

4.2.1 Auswirkungen des CYP2D6-Polymorphismus auf den Trimipraminmetabolismus

Es ist bekannt, dass trizyklische Antidepressiva durch polymorphe Cytochrom P450-Enzyme verstoffwechselt werden (Venkatakrishnan et al., 1998; Bertilsson et al., 1997). Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die den Einfluss von 3 polymorphen Enzymen - CYP2D6, CYP2C19 und CYP2C9 - auf die Pharmakokinetik eines trizyklischen Antidepressivums *in vivo* untersucht.

Das Enzym CYP2D6 spielt im Metabolismus von Trimipramin eine sehr wichtige Rolle, was in *Abbildung 10* klar ersichtlich wird. Die Gruppe der CYP2D6-Langsammetabolisierer wies sowohl die höchsten Plasmakonzentrationen von Trimipramin als

auch seines Metaboliten N-Desmethyltrimipramin auf, was darauf hindeutet, dass das Enzym den Abbau beider pharmakologisch aktiver Substanzen maßgeblich katalysiert. Die vorliegende Studie demonstriert, dass der Metabolismus von Trimipramin abhängig von der Anzahl aktiver CYP2D6-Allele ist, da die einzelnen Untergruppen des CYP2D6-Genotyps deutlich unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften mit niedriger *within*-Gruppenvariabilität besitzen (*Abbildung 9*). Zahlreiche Studien bewiesen, dass CYP2D6 vor allen Dingen die Hydroxylierung der Strukturanaloga Amitriptylin, Imipramin und Desipramin katalysiert (Mellström et al., 1986; Baumann et al., 1986; Brosen et al., 1986; Madsen et al., 1996). Da bei unseren Messungen die Plasmakonzentrationen sowohl der Muttersubstanz als auch ihres Metaboliten bei CYP2D6-PMs erhöht waren, lässt sich hieraus schließen, dass dieses Enzym auch die Hydroxylierung von N-Desmethyltrimipramin katalysiert. Dies deckt sich mit dem Ergebnis einer klinischen Studie, bei der bei einem einzelnen Patienten mit einem CYP2D6-PM-Phänotyp die höchsten N-Desmethyltrimipraminspiegel aller Studienteilnehmer gemessen wurden (Eap et al., 2000).

Wie die meisten anderen trizyklischen Antidepressiva besitzt Trimipramin bei oraler Gabe eine relativ niedrige Bioverfügbarkeit. In der vorliegenden Studie wies die Gruppe der Schnellmetabolisierer eine orale Clearance auf, die weit über der physiologisch möglichen Leberdurchflussrate lag, was für einen starken *First-pass*-Metabolismus spricht. In einer grundlegenden pharmakokinetischen Studie aus dem Jahr 1984 mit oraler und intravenöser Medikamentenapplikation wurde die systemische Clearance mit etwa 70 l/h (15,9 ml/min/kg) und die durchschnittliche Bioverfügbarkeit mit 41,4 % (17,8 – 62,7) angegeben (Abernethy et al., 1984). Diese Ergebnisse decken sich mit den Schätzungen der vorliegenden Arbeit, bei denen die Clearance in der Referenzgruppe zwischen 180 und 444 l/h und in der Gruppe der CYP2D6-PMs zwischen 24 und 48 l/h liegt. Eine kürzlich erschienene Studie, die Trimipraminkonzentrationen nach intravenöser Applikation und unter Steady-state-Bedingungen in Abhängigkeit vom CYP2D6-Genotyp untersuchte, bestätigte diese Ergebnisse (Kirchheiner et al., 2003). Die relative Bioverfügbarkeit betrug hier 44 %, 16 % und 12 % in den Gruppen der CYP2D6-EMs, -PMs und -UMs, während die systemische Clearance entsprechend bei 12 l/h, 24 l/h und 30 l/h lag. Diese Daten demonstrieren auch, dass der Genotyp des Ultraschnellmetabolisierers ebenfalls von klinischer Bedeutung ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bioverfügbarkeit und die systemische Clearance signifikant vom CYP2D6-Genotyp abhängig sind und dies

ihre hohe interindividuelle Variabilität, die in früheren Studien beobachtet wurde, erklären kann.

Einen zusätzlichen Aspekt lieferten *Eap et al.*, indem sie eine stereospezifische Analyse des Trimipraminmetabolismus durchführten. Sie beschrieben eine Enantioselektivität des Abbaus von Trimipramin, demzufolge CYP2D6 die Hydroxylierung ausschließlich des L-Enantiomers von Trimipramin hydroxyliert, während CYP2C19 die N-Demethylierung mit Präferenz des D-Enantiomers katalysiert (Eap et al., 2000). Dies ist möglicherweise von besonderem Interesse, da man weiß, dass L-Trimipramin eine höhere Affinität zu Dopamin-, Noradrenalin- und 5-Hydroxytryptaminrezeptoren besitzt als das D-Enantiomer (Gross et al., 1991). Folglich übt der CYP2D6-Genotyp möglicherweise einen noch größeren Einfluss auf die pharmakologische Aktivität und die klinische Wirkung von Trimipramin aus, als dies durch die vorliegenden pharmakokinetischen Daten erklärt würde. Um die pharmakologische Aktivität der Enantiomere von Trimipramin und N-Desmethyltrimipramin und ihre klinische Relevanz zu klären, werden weitere klinisch-pharmakologische Studien notwendig sein.

4.2.2 Auswirkungen der CYP2C19- und CYP2C9-Polymorphismen auf den Trimipraminmetabolismus

Der Einfluss der zwei untersuchten Enzyme aus der CYP2C-Familie auf den Abbau von Trimipramin ist wesentlich geringer. Beispielsweise besitzt ihr Polymorphismus keinen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit dieses Medikaments. In der Mehrzahl der Proben von CYP2C19-PMs und CYP2C9-PMs lag die Konzentration von N-Desmethyltrimipramin unter der Bestimmungsgrenze, was die Vermutung nahe legt, dass diese Enzyme an der N-Demethylierung von Trimipramin beteiligt sind, was sich mit den Ergebnissen früherer Arbeiten deckt.

Eine kürzlich erschienene klinische Untersuchung ergab, dass der (S)/(R)-Mephenytoin-Quotient mit dem Quotienten aus den D-Enantiomeren von Trimipramin und N-Desmethyltrimipramin korreliert (Eap et al., 2000). In der gleichen Studie wurden bei dem einzigen Studienteilnehmer mit einem CYP2C19-PM-Phänotyp die höchsten Trimipraminspiegel aller Probanden gemessen. Der Vergleich mit strukturverwandten trizyklischen Antidepressiva ergibt weiteren Aufschluss. Eine *In-vitro*-Studie wies nach, dass CYP2C19 hohe Affinität zu Amitriptylin besitzt und das wichtigste Enzym bei dessen N-Demethylierung ist (Venkatakrishnan et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse erbrachten Studien mit Imipramin und Desipramin, die ebenfalls

CYP2C19 als das wichtigste N-demethylierende Enzym identifizierten (Skjelbo et al., 1993; Madsen et al., 1997; Koyama et al., 1996). Weitere Enzyme, die in geringerem Maße an der N-Demethylierung von Amitriptylin und Imipramin beteiligt sind, scheinen CYP2C9 und CYP3A4 zu sein (Venkatakrishnan et al., 1998; Venkatakrishnan et al., 2001; Madsen et al., 1997). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Studie bestätigt, dass Trimipramin von dem polymorphen Enzym CYP2D6 hydroxyliert wird, während CYP2C19, CYP2C9 und weitere Cytochrom-Enzyme die N-Demethylierung katalysieren.

4.3 Klinischer Bezug der Ergebnisse

4.3.1 Individualisierung der antidepressiven Pharmakotherapie

Die antidepressive Pharmakotherapie weist vorrangig zwei Probleme auf: ungenügende Therapieresponse sowie nicht tolerierbare Nebenwirkungen (Coutts and Urichuk, 1999). Nur etwa 30 – 40 % der behandelten Patienten erlangen eine vollständige Remission (Möller, 1991; Nelson, 2003) und starke Nebenwirkungen haben eine häufig beobachtete Noncompliance der Patienten zur Folge (Rao et al., 1996, Burke und Preskorn, 1999). Ein wichtiger Grund für diese Tatsache scheint eine nicht adäquate Wirkstoffkonzentration im Patientenblut zu sein, wie sie gerade bei der Therapie mit trizyklischen Antidepressiva mit hoher interindividueller Variabilität vielfach beschrieben wurde (Lazarou et al., 1998; Kirchheiner et al., 2001; Rao et al., 1996). Weiterhin ist bekannt, dass ein gutes Outcome und geringe Toxizität mit einer geringen Fluktuation der Medikamentenplasmakonzentration im therapeutischen Fenster assoziiert ist (Preskorn et al., 1988; Loo et al., 1980). Somit scheint eine wichtige Bedingung für eine optimierte Pharmakotherapie ein möglichst konstanter und vorher-sagbarer Medikamentenspiegel unter Berücksichtigung von dessen Einflussfaktoren zu sein (Burke and Preskorn, 1999; Rao et al., 1996).

Eine Einflussgröße, die in zunehmendem Maße eine wichtige Rolle in der klinischen Praxis spielt, ist die individuelle genetische Prädisposition der arzneimittel-metabolisierenden Enzyme eines Patienten (Rao et al., 1996; Coutts and Urichuk, 1999). Träger einer genetischen Variante eines Cytochrom-Enzyms weisen häufig unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften zur Durchschnittspopulation auf. Bei einer herkömmlichen Medikamentendosis sind Langsammetabolisierer durch eine Akkumulation des Wirkstoffs oder seines Metaboliten gefährdet, häufiger und stärkere Nebenwirkungen bis hin zu toxischen Effekten zu erleiden, während bei sehr

schnellen Metabolisierern die Plasmakonzentration zu gering sein kann. Somit sollte der individuellen Konstitution eines Patienten durch eine individualisierte Dosisanpassung Rechnung getragen werden, bei der Langsammetabolisierer eine niedrigere Dosis und sehr schnelle Metabolisierer eine entsprechend höhere Dosis im Vergleich zum Populationsdurchschnitt erhalten (Brockmöller et al., 2000; Alvan et al., 2001; Kirchheiner et al., 2001; Evans and McLeod, 2003).

4.3.2 Genotypabhängige Dosisanpassungen für Doxepin und Trimipramin

4.3.2.1 Voraussetzungen für eine Dosisanpassung

Eine individuelle Dosisanpassung anhand des CYP-Genotyps bedeutet einen erhöhten wissenschaftlichen und klinischen Aufwand, der nur bei geeigneten Medikamenten klinisch sinnvoll und finanziell vertretbar ist. Die pharmakologischen Eigenschaften von Doxepin und Trimipramin, die in dieser Arbeit und in vorherigen Veröffentlichungen beschrieben wurden, rechtfertigen diesen Aufwand, wie nachfolgend erläutert wird.

Auswahl des Medikaments. Medikamente, die für Dosisanpassungen in Frage kommen, sollten hohe interindividuelle Plasmaspiegelschwankungen bei gleichzeitiger geringer therapeutischer Breite und spätem Wirkungseintritt aufweisen. Dies trifft für trizyklische Antidepressiva wie Trimipramin und Doxepin zu und wurde mehrfach beschrieben (u.a. Kirchheiner et al., 2001). Bei beiden Medikamenten scheint es eine eindeutige Korrelation zwischen zu hoher Konzentration und Nebenwirkungen bis hin zu toxischen Effekten zu geben (Meatherall et al., 1983; Fraser et al., 1987; Musshoff et al., 1999; Rao et al., 1996; Pinder, 1977), während zu niedrige Plasmaspiegel mit Nonresponse korrelieren (Rao et al., 1996; Burke und Preskorn, 1999). Es ist wahrscheinlich, dass eine dosisadaptierte Therapie mit Doxepin und Trimipramin die Sicherheit des Patienten klinisch relevant erhöht und somit sinnvoll ist.

Beteiligung von Cytochrom-Enzymen. Eine Voraussetzung für eine Dosisanpassung in Abhängigkeit des CYP-Genotyps ist, dass mindestens ein polymorphes Enzym signifikant die Pharmakokinetik eines Medikaments verändert. Die vorliegende Studie bestätigte, dass CYP2D6 maßgeblichen Einfluss auf den Metabolismus von Doxepin und Trimipramin besitzt. Bei oraler Einnahme von Doxepin wiesen CYP2D6-PMs einen etwa 4-fachen Unterschied der pharmakokinetischen Parameter im Vergleich zur Referenzgruppe auf. Bei Betrachtung der klinisch wichtigeren

Summe aus Doxepin und N-Desmethyldoxepin war der Unterschied sogar noch größer. Schätzungen anhand der vorliegenden Ergebnisse ergeben bis zu 10-fache Steady-state-Plasmaspiegel für CYP2D6-PMs im Vergleich zu CYP2D6-EMs bei einer Gabe von 150 mg Trimipramin, wenn man eine lineare Kinetik für Trimipramin im Bereich von 75 mg bis 150 mg voraussetzt. Die großen pharmakokinetischen Differenzen deuten daraufhin, dass Träger zweier inaktiver CYP2D6-Allele eventuell ein größeres Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen tragen, während Schnellmetabolisierer tendenziell häufiger subtherapeutische Medikamentenspiegel mit Therapieversagen aufweisen. Somit kann eine Berücksichtigung des CYP2D6-Genotyps bei der Gabe dieser zwei Medikamente zu einer klinisch signifikanten Therapieverbesserung führen. Anders verhält es sich mit CYP2C9 und CYP2C19. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass diese beiden Enzyme am Stoffwechsel von Trimipramin und Doxepin beteiligt sind. In Anbetracht ihres vergleichsweise geringen Einflusses auf den Metabolismus sowie der niedrigen Frequenz der inaktiven Allele in der kaukasischen Bevölkerung scheint jedoch eine routinemäßige Dosisanpassung, die sich nach dem CYP2C9- und CYP2C19-Genotyp richtet, nicht gerechtfertigt.

4.3.2.2 Berechnung der adaptierten Dosen

Dosisangaben des Herstellers werden normalerweise aus umfangreichen Studien in genetisch gemischten Populationen gewonnen und sind als Kompromiss anzusehen, um eine möglichst sichere und gleichzeitig effektive Therapie für EMs und PMs zu gewährleisten. Der gut etablierte Bioäquivalenzansatz ermöglicht die Berechnung einer genotypabhängigen Medikamentendosis unter Berücksichtigung von pharmakokinetischen Parametern wie AUC oder oraler Clearance (Brockmöller et al., 2000). Hierbei wird vorausgesetzt, dass die spezifischen Dosen für PMs und EMs mit der AUC korrespondieren und somit beispielsweise ein PM mit der doppelten AUC eines EMs nur die halbe Dosis für eine ähnliche Konzentrations-Zeit-Kurve benötigt wie der EM.

Wir gingen für das Enzym CYP2D6 von 50 % EMs, 40 % IMs und 10 % PMs in der kaukasischen Bevölkerung aus und verwendeten zur Berechnung der Dosisanpassungen die von *Kirchheiner et al.* beschriebene Methode (Kirchheiner et al., 2001). Aus den Werten der *Tabellen 11* und *14* ergaben sich folglich gerundete prozentuale Dosisempfehlungen, die in *Tabelle 15* abgebildet sind.

Tabelle 15: Dosisempfehlungen für Doxepin und Trimipramin in Abhängigkeit von CYP2D6-Genotyp

	CYP2D6-EMs	CYP2D6-IMs	CYP2D6-PMs
Doxepin	114 %	85 %	34 %
Trimipramin	149 %	40 %	9 %

Aufgrund der niedrigen Allelfrequenz in Deutschland mit etwa 3 % vernachlässigten wir bei der Berechnung der Dosen die Gruppe der sehr schnellen Metabolisierer (UMs). Da dieser Genotyp jedoch in anderen Populationen häufiger vorkommt, sollte er dementsprechend berücksichtigt werden. Setzt man eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl aktiver Gene und der Plasmakonzentration voraus, lässt sich eine Dosisanpassung für UMs einfach errechnen.

4.3.2.3 Erläuterungen zur Berechnung von Dosisanpassungen

Aktive Metaboliten und enantioselektiver Metabolismus. Die therapeutische Rolle aktiver Metaboliten und einzelner Isomere von trizyklischen Antidepressiva ist bisher nur selten beschrieben worden und beruht in der Regel auf Rezeptorbindungsstudien *in vitro*. Wie schon erwähnt, besitzen die Metaboliten N-Desmethyldoxepin und N-Desmethyltrimipramin pharmakologische Aktivität. Doxepin und Trimipramin weisen einen stereoselektiven Metabolismus auf und es gibt Anzeichen für unterschiedliche pharmakologische Qualitäten der einzelnen Isomere. Trotzdem benutzten wir zur Berechnung der Dosisanpassung lediglich die Summen der AUCs der Muttersubstanz und ihres Metaboliten, wie es in anderen Publikationen empfohlen wird (u.a. Kirchheiner et al., 2004).

Beziehung zwischen Dosis und Plasmakonzentration. Dosisempfehlungen, die auf pharmakokinetischen Parametern - wie der in dieser Arbeit verwendeten AUC – basieren, setzen eine lineare Beziehung zwischen der Menge eines verabreichten Medikaments und seiner Plasmakonzentration voraus. Obwohl widersprüchliche Arbeiten und Einzelfallberichte zu Doxepin und Trimipramin existieren, bei denen teilweise eine Nonlinearität der Dosis-Plasma-Korrelation beobachtet wurde (Ereshefsky et al., 1988, Joyce and Sharman, 1985, Musa, 1989, Eap et al., 2000), gelten trizyklische Antidepressiva als Medikamente mit linearer Pharmakokinetik (Amsterdam et al., 1980) und rechtfertigen somit eine Dosisanpassung nach dem Bioäquivalenzprinzip.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der genetische Polymorphismus des Enzyms Cytochrom P-450-2D6 signifikanten Einfluss auf die Pharmakokinetik von Doxepin und Trimipramin *in vivo* ausübt. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint eine Dosisanpassung in Abhängigkeit vom CYP2D6-Genotyp sinnvoll, um das Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen bei CYP2D6-PMs zu reduzieren. Dennoch müssen weitere klinische Studien zeigen, ob Patienten, die der Gruppe der CYP2D6-PMs, -IMs und -UMs angehören, tatsächlich statistisch signifikant unterschiedlich auf die Einnahme von Doxepin oder Trimipramin reagieren im Vergleich zu Schnellmetabolisierern. In diesem Sinne wären prospektive Studien, bei denen eine dem CYP2D6-Genotyp entsprechend behandelte Patientengruppe mit einer anderen Gruppe ohne Genotypisierung verglichen würde, ein weiterer Schritt zur Validierung der vorliegenden Ergebnisse und um den tatsächlichen therapeutischen Benefit einer Dosisanpassung bei Patienten beurteilen zu können. Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass die CYP2C9- und CYP2C19-Polymorphismen ebenfalls eine Rolle für den Metabolismus der zwei untersuchten Antidepressiva spielen. Allerdings scheint ihr Einfluss begrenzt und somit klinisch vernachlässigbar.

Die Pharmakotherapie der Depression wird von vielen Überlegungen geleitet. Neben dem Wissen über Pharmakodynamik und -kinetik eines Medikaments spielen die Art und die Schwere der Depression, Compliance des Patienten, Begleiterkrankungen sowie Komedikation eine Rolle. All diesen individuellen Faktoren sollte Rechnung getragen werden, um eine möglichst sichere und effiziente Therapie eines Patienten zu erzielen. In diesem Zusammenhang stellen die in der vorliegenden Arbeit empfohlenen Dosen lediglich eine Optimierung dar. Natürlich kann eine CYP2D6-abhängige Dosisanpassung von Doxepin und Trimipramin bei längerfristiger Gabe nicht die ärztliche klinische Beobachtung und therapeutisches Drugmonitoring ersetzen, könnte jedoch als sinnvolle Ergänzung in Erwägung gezogen werden, wie diese Arbeit demonstriert.

Literaturverzeichnis

- Abernethy DR, Greenblatt DJ, Shader RI. Trimipramine kinetics and absolute bioavailability: Use of gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. Clin Pharmacol Ther 1984: 35(3), 348-353.
- Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. J Pharmacol Exp Ther 1996: 278(1), 441-446.
- Alvan G, Bertilsson L, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Moving toward genetic profiling in patient care: the scope and rationale of pharmacogenetic/ecogenetic investigation. Drug Metab Dispos 2001: 29(4 pt 2), 580-585.
- Amsterdam J, Brunswick D, Mendels J. The clinical application of tricyclic antidepressant pharmacokinetics and plasma levels. Am J Psychiatry 1980: 137(6), 653-62.
- Assalian P, Rosengarten MD, Phillips R. Comparative Trial of Trimipramine versus Doxepin in depressed hospitalised Patients. Drugs 1989: 38, 32-34.
- Baumann P, Jonzier Perey M, Koeb L, Küpfer A, Tinguely D, Schopf J. Amitriptyline pharmacokinetics and clinical response: II. Metabolic polymorphism assessed by hydroxylation of debrisoquine and mephenytoin. Int Clin Psychopharmacol 1986: 1(2), 102-112.
- Benkert O und Hippus H. Antidepressiva. In: Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie 2003, S. 1 – 52. Springer Verlag Berlin – Heidelberg, 2003.
- Berger M und Gastpar M. Trimipramine: a challenge to current concepts on antidepressives. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 1996: 246(5), 235-239.
- Bertilsson L, Dahl ML, Tybring G. Pharmacogenetics of antidepressants: Clinical aspects. Acta Psychiatr Scand 1997: 96, 14-21.
- Bertilsson L, Lou YQ, Du YL, Liu Y, Kuang TY, Liao XM, Wang KY, Reviriego J, Iselius L, Sjöqvist F. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and S-mephenytoin. Clin Pharmacol Ther 1992: 51(4), 388-397.
- Bertz RJ und Grannemann GR. Use of In Vitro and In Vivo Data to Estimate the Likelihood of Metabolic Pharmacokinetic Interactions. Clin Pharmacokinet 1997: 32(3), 210-258.
- Bhasker CR, Miners JO, Coulter S, Birkett DJ. Allelic and functional variability of cytochrome P4502C9. Pharmacogenetics 1997: 7, 51-58.
- Bogaert MG, Rosseel MT, Deberdt R, Vranckx C. Plasma Levels of the cis- and trans-Isomers of Doxepin and Desmethyldoxepin after Administration of Doxepin to Patients. Arzneimittel Forschung 1981: 31, 113-115.
- Bolaji OO, Coutts RT, Baker GB. Metabolism of trimipramine in vitro by human CYP2D6 isozyme. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1993: 82, 111-120.
- Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their

- descendants. *Pharmacogenomics* 2002: 3(2), 229-243.
- Brockmöller J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I. Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics* 2000: 1(2), 125-151.
- Brosten K, Otton SV, Gram LF. Imipramine demethylation and hydroxylation: impact of the sparteine oxidation phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 1986: 40(5), 543-549.
- Burke MJ and Preskorn SH. Therapeutic drug monitoring of antidepressants. *Clin Pharmacokinet* 1999: 37(2), 147-165.
- Coutts RT und Urichuk LJ. Polymorphic Cytochrome P450 and Drugs Used in Psychiatry. *Cell Molr Neurobiol* 1999: 19(3), 325-54.
- Daly AK, Brockmöller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, et al.. Nomenclature for human CYP2D6. *Pharmacogenetics* 1996: 6(3), 193-201.
- de Groot MJ, Bijloo GJ, Martens BJ, van Acker FA, Vermeulen NP. A refined substrate model for human cytochrome P450 2D6. *Chem Res Toxicol* 1997: 10(1), 41-48.
- de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P450 isozymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol Exp Ther* 1990: 253(1), 387-393.
- Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB, Kim RB, Wood AJ, Stein CM, Wilkinson GR, Schwarz UI. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol* 2001: 60(2), 382-7.
- Eap CB, Bender S, Gastpar M, Fischer W, Haarmann C, Powell K, Jonzier-Perey M, Cochard N, Baumann P. Steady state plasma levels of the enantiomers of trimipramine and of its metabolites in CYP2D6-, CYP2C19 and CYP3A4/5-phenotyped patients. *Ther Drug Monit* 2000: 22(2), 209-214.
- Eap CB, Laurian S, Souche A, Koeb L, Reymond P, Buclin T, Baumann P. Influence of Quinidine on the Pharmacokinetics of Trimipramine and on Its Effect on the Waking EEG of Healthy Volunteers. *Neuropsychobiology* 1992: 25(4), 214-220.
- Eikmeier G, Berger M, Lodemann E, Muszynski K, Kaumeier S, Gastpar M. Trimipramine - an atypical neuroleptic? *Int Clin Psychopharmacol* 1991: 6(3), 147-53.
- Ereshefsky L, Tran-Johnson T, Davis CM, LeRoy A. Pharmacokinetic factors affecting antidepressant Drug Clearance and clinical effect: Evaluation of Doxepin and Imipramine - New Data and Review. *Clin Chem* 1988: 34(5), 863-880.
- Evans WE und McLeod HL. Pharmacogenomics - Drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003: 348(6), 538-549.
- Fachinformation Aponal® 75/ Aponal® 100 (1999). Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland.
- Faulkner RD, Pitts WM, Lee CS, Lewis WA, Fann WE. Multiple-dose doxepin kinetics in depressed patients. *Clin Pharmacol Ther* 1983: 34(4), 509-515.

- Ferguson RJ, De Morais SM, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, Wilkinson GR, Sarich TC, Wright JM, Dayer P, Goldstein JA. A new genetic defect in human CYP2C19: Mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **284**(1), 356-61.
- Fraser AD, Isner AF, Perry RA. Distribution of trimipramine and its major metabolites in a fatal overdose case. *J Anal Toxicol* 1987; **11**(4), 168-170.
- Ghabrial H, Prakash C, Tacke UG, Blair IA, Wilkinson GR. Geometric isomerization of doxepin during its N-demethylation in humans. *Drug Metab Dispos* 1991; **19**(3), 596-599.
- Ghahramani P, Ellis SW, Lennard MS, Ramsay LE, Tucker GT. Cytochromes P450 mediating the N-demethylation of amitriptyline. *Br J Clin Pharmacol* 1997; **43**(2), 137-44.
- Gilham DE, Cairns W, Paine MJ, Modi S, Poulsom R, Roberts GC, Wolf CR. Metabolism of MPTP by cytochrome P4502D6 and the demonstration of 2D6 mRNA in human foetal and adult brain by in situ hybridization. *Xenobiotica* 1997; **27**(1), 111-125.
- Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001; **52**(4), 349-55.
- Goldstein JA und de Morais SM. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 1994; **4**(6), 285-299.
- Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988; **331**(6155), 442-446.
- Gonzalez FJ und Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal plant "warfare", molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 1990; **6**, 182-186.
- Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 1992; **267**(1), 83-90.
- Gray IC, Nobile C, Muresu R, Ford S, Spurr NK. A 2.4-Megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics* 1995; **28**(2), 328-332.
- Gross G, Xin X, Gastpar M. Trimipramine: pharmacological reevaluation and comparison with clozapine. *Neuropharmacology* 1991; **30**(11), 1159-66.
- Haining RL, Hunter AP, Veronese ME, Trager WF, Rettie AE. Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch Biochem Biophys* 1996; **333**(2), 447-458.
- Haritos VS, Ghabrial H, Ahokas JT, Ching MS. Role of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) in the stereospecific metabolism of E- and Z-doxepin. *Pharmacogenetics* 2000; **10**(7), 591-603.
- Härtter S, Tybring G, Friedberg T, Weigmann H, Hiemke C. N-demethylation of the doxepin isomers is mainly catalyzed by the polymorphic CYP2C19. *Pharma Res* 2002; **19**(7), 1035-1038.

- Hauser K, Olpe HR, Jones RS. Trimipramine, a tricyclic antidepressant exerting atypical actions on the central noradrenergic system. *Eur J Pharmacol* 1985: *111*(1), 23-30.
- Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun* 1998: *249*(3), 838-843.
- Hrdina PD, Bakish D, Swenson S, Lapierre YD. Cis- and Trans-Isomers of Doxepin and Desmethyldoxepin in the Plasma of Depressed Patients Treated with Doxepin. *Ther Drug Monit* 1990: *12*(2), 129-133.
- Ibeanu GC, Blaisdell J, Ghanayem BI, Beyeler C, Benhamou S, Bouchardy C, Wilkinson GR, Dayer P, Daly AK, Goldstein JA. An additional defective allele, CYP2C19*5, contributes to the S-mephenytoin poor metabolizer phenotype in Caucasians. *Pharmacogenetics* 1998: *8*(2), 129-35.
- Ieiri I, Tainaka H, Morita T, Hadama A, Mamiya K, Hayashibara M, Ninomiya H, Ohmori S, Kitada M, Tashiro N, Higuchi S, Otsubo K. Catalytic activity of three variants (Ile, Leu, and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. *Ther Drug Monit* 2000: *22*(3), 237-44.
- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: An opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999: *20*(8), 342-349.
- Johansson I, Lundqvist E, Dahl M-L, Ingelman-Sundberg M. PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. *Pharmacogenetics* 1996: *6*(4), 351-355.
- Jones BC, Hawksworth G, Horne VA, Newlands A, Morsman J, Tute MS, Smith DA. Putative active site model for cytochrome P450C9 (tolbutamide hydroxylase). *Drug Metab Dispos* 1996: *24*, 260-266.
- Jones JP, He M, Trager WF, Rettie AE. Three dimensional quantitative structure-activity relationship for inhibitors of cytochrome P450C9. *Drug Metab Dispos* 1996: *24*(1), 1-6.
- Joyce PR, Sharman JR. Doxepin plasma concentrations in clinical practice: could there be a pharmacokinetic explanation for low concentrations? *Clin Pharmacokinet* 1985: *10*(4), 365-370.
- Kidd RS, Curry TB, Gallagher S, Edeki T, Blaisdell J, Goldstein JA. Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics* 2001: *11*(9), 803-8.
- Kidd RS, Straughn AB, Meyer MC, Blaisdell J, Goldstein JA, Dalton JT. Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9*3 allele. *Pharmacogenetics* 1999: *9*(1), 71-80.
- Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene and a pseudogene. *Am J Hum Genet* 1989: *45*(6), 889-904.
- Kirchheiner J, Brosen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I, Sjoqvist F, Spina E, Brockmüller J. CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* 2001: *104*(3), 173-192.

- Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong M-L, Licinio J, Roots I, Brockmöller J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: The contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 2004: 9(5), 442-73.
- Kirchheiner J, Sasse J, Meineke I, Roots I, Brockmöller J. Trimipramine pharmacokinetics after intravenous and oral administration in carriers of CYP2D6 genotypes predicting poor, extensive and ultrahigh activity. *Pharmacogenetics* 2003: 13, 721-728.
- Koyama E, Tanaka T, Chiba K, Kawakatsu S, Morinobu S, Totsuka S, Ishizaki T. Steady-state plasma concentrations of imipramine and desipramine in relation to S-mephenytoin 4'-hydroxylation status in Japanese depressive patients. *J Clin Psychopharmacol* 1996: 16(4), 286-293.
- Koymans LM, Vermeulen NP, Baarslag A, Donne-Op den Kelder GM A preliminary 3D model for cytochrome P450 2D6 constructed by homology model building. *J Comput Aided Mol Des* 1993: 7(3), 281-289.
- Kupfer A und Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1984: 26(6), 753-9.
- Kutt H, Wolk M, Scherman R, McDowell F. Insufficient parahydroxylation as a cause of diphenylhydantoin toxicity. *Neurology* 1964: 14, 542-548.
- Landi MT, Ceroni M, Martignoni E, Bertazzi PA, Caporaso NE, Nappi G. Gene-environment interaction in parkinson's disease. The case of CYP2D6 gene polymorphism. *Adv Neurol* 1996: 69, 61-72.
- Lapierre YD. A Review of Trimipramine: 30 years of clinical use. *Drugs* 1989: 38, 17-24.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998: 279(15), 1200-1205.
- Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 2002: 12(3), 251-263.
- Leucht S, Steimer W, Kreuz S, Abraham D, Orsulak PJ, Kissling W. Doxepin plasma concentrations: is there really a therapeutic range? *J Clin Psychopharmacol* 2002: 21(4), 432-439.
- Lohse MJ und Müller-Oerlinghausen B. Psychopharmaka. In : Schwabe U/ Paffrath D (Hrsg.), *Arznei-verordnungs-Report* 1999. S. 537 ff.. Springer-Verlag Berlin – Heidelberg, 1999.
- Loo H, Benyacoub AK, Rovei V, Altamura CA, Vadrot M, Morselli PL. Long-term monitoring of tricyclic antidepressant plasma concentrations. *Br J Psychiatry* 1980: 137, 444-451.
- Luchins DJ, Oliver AP, Wyatt RJ. Seizures with antidepressants: an in vitro technique to assess relative risk. *Epilepsia* 1984: 25(1), 25-32.
- Madsen H, Hansen TS, Brosen K. Imipramine metabolism in relation to the sparteine oxidation polymorphism - a family study. *Pharmacogenetics* 1996: 6(6), 513-519.
- Madsen H, Nielsen KK, Brosen K. Imipramine metabolism in relation to the sparteine and mephenytoin oxidation polymorphisms - a population study. *Br J Clin Pharmacol* 1995: 39(4), 433-439.

- Madsen H, Rasmussen BB, Brosen K. Imipramine demethylation in vivo: impact of CYP1A2, CYP2C19, and CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 61(3), 319-324.
- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977; 2(8038), 584-586.
- Mancy A, Broto P, Dijols S, Dansette PM, Mansuy D. The substrate binding site of human liver cytochrome P4502C9: An approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modelling. *Biochemistry* 1995; 34, 10365-10375.
- Martinez C, Agundez JA, Gervasini G, Martin R, Benitez J. Tryptamine: a possible endogenous substrate for CYP2D6. *Pharmacogenetics* 1997; 7(2), 85-93.
- Meatherall RC, Guay DR, Nokes JM, Keenan JR. Toxicological findings in a death resulting from the ingestion of trimipramine. *J Forensic Sci* 1983; 28(4), 1023-1029.
- Meehan RR, Gosden JR, Rout D, Hastie ND, Friedberg T, Adesnik M, Buckland R, van Heyningen V, Fletcher J, Spurr NK, et al. Human cytochrome P-450 PB-1: a multigene family involved in mephenytoin and steroid oxidations that maps to chromosome 10. *Am J Hum Genet* 1988; 42(1), 26-37.
- Mellström B, Bertilsson L, Sawe J, Schulz HU, Sjoqvist FE- and Z-10-hydroxylation of nortriptyline: relationship to polymorphic debrisoquine hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther* 1981; 30(2), 189-193.
- Mellström B, Sawe J, Bertilsson L, Sjoqvist F. Amitriptyline metabolism: association with debrisoquin hydroxylation in nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 39(4), 369-371.
- Meyer-Barner M, Meineke I, Schreeb KH, Gleiter CH. Pharmacokinetics of doxepin and desmethyldoxepin - an evaluation with the population approach. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; 58(4), 253-257.
- Midha KK, Hubbard JW, McKay G, Hawes EM, Korchinski ED, Gurnsey T, Cooper JK, Schwede R. Stereoselective pharmacokinetics of doxepin isomers. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 42(5), 539-544.
- Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45(6), 525-538.
- Möller HJ. Therapy resistance to antidepressive drugs: risk factors and treatment possibilities. *Nervenarzt* 1991; 62(11), 654-669.
- Mouret J, Lemoine P, Minuit MP, Sanchez P, Taillard J. Sleep Polygraphic Effects of Trimipramine in depressed Patients: Preliminary Report. *Drugs* 1989; 38, 14-16.
- Musa MN. Nonlinear kinetics of trimipramine in depressed patients. *J Clin Pharmacol* 1988; 29(8), 1038-1039.
- Musshoff F, Schmidt P, Madea B. Fatality caused by a combined trimipramine-citalopram intoxication. *Forensic Sci Int* 1999; 106(2), 125-131.
- Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do

- they exist? *Am J Hum Genet* 1997: 60(2), 265-271.
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, et al. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987: 6(1), 1-11.
- Nelson JC. Managing treatment-resistant major depression. *J Clin Psychiatry* 2003: 64 Suppl. 1, 5-12.
- Nielsen KK, Brosen K, Gram LF. Steady-state plasma levels of clomipramine and its metabolites: Impact of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. Danish University Antidepressant Group. *Eur J Clin Pharmacol* 1992: 43(4), 405-411.
- Pecknold JC und Luthe L. Trimipramine, Anxiety, Depression and Sleep. *Drugs* 1989: 38 Suppl. 1, 25-31.
- Petersen RC und Richelson E. Anticholinergic Activity of Imipramine and Some Analogs at Muscarinic Receptors of Cultured Mouse Neuroblastoma Cells. *Psychopharmacology* 1982: 76(1), 26-28.
- Pinder RM, Brogden RN, Speight TM, Avery GS. Doxepin up-to-date: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy with particular reference to depression. *Drugs* 1977: 13(3), 161-218.
- Preskorn SH, Dorey RC, Jerkovich GS. Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants. *Clin Chem* 1988: 34(5), 822-828.
- Randrup A und Bræstrup C. Uptake Inhibition of Biogenic Amines by Newer Antidepressant Drugs: Relevance to the Dopamine Hypothesis of Depression. *Psychopharmacology* 1977: 53(3), 309-314.
- Rannug A, Alexandrie AK, Persson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochromes P450 1A1, 2D6 and 2E1: regulation and toxicological significance. *J Occup Environ Med* 1995: 37(1), 25-36.
- Rao ML, Deister A, Laux G, Staberock U, Höflich G, Möller HJ. Low serum levels of tricyclic antidepressant in amitriptyline- and doxepin-treated inpatients with depressive syndromes are associated with nonresponse. *Pharmacopsychiatry* 1996: 29(3), 97-102.
- Relling MV, Aoyama T, Gonzalez FJ, Meyer UA. Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther* 1990: 252(1), 442-447.
- Richelson E und Nelson A. Antagonism by Antidepressants of Neurotransmitter Receptors of normal human brain *In Vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 1984: 230(1), 94-102.
- Rüther E. Depression, Circadian Rhythms and Trimipramine. *Drugs* 1989: 38 Suppl 1, 1-3.
- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997: 60(2), 284-295.
- Scott J und Poffenbarger PL. Pharmacogenetics of tolbutamide metabolism in humans. *Diabetes* 1979: 28(1), 41-51.
- Seifritz E, Holsboer-Trachsler E, Hemminger U, Eap CB, Baumann P. Increased trimipramine plasma

- levels during fluvoxamine comedication. *Eur Neuropsychopharmacol* 1994: 4(1), 15-20.
- Settle EC Jr und Ayd FJ Jr. Trimipramine: twenty years' worldwide clinical experience. *J Clin Psychiatry* 1980: 41(8), 266-274.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual Variations in Human Liver Cytochrome P-450 Enzymes Involved in the Oxidation of Drugs, Carcinogens and Toxic Chemicals: Studies with Liver Microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994: 270(1), 414-423.
- Shu YZ, Hubbard JW, Cooper JK, McKay G, Korchinski ED, Kumar R, Midha KK. The identification of urinary metabolites of doxepin in patients. *Drug Metab Dispos* 1990: 18(5), 735-741.
- Skjelbo E, Gram LF, Brosen K. The N-demethylation of imipramine correlates with the oxidation of S-mephenytoin (S/R-ratio). A population study. *Br J Clin Pharmacol* 1993: 35(3), 331-334.
- Spina E, Gitto C, Avenoso A, Campo GM, Caputi AP, Perucca E. Relationship between plasma desipramine levels, CYP2D6 phenotype and clinical response to desipramine: a prospective study. *Eur J Clin Pharmacol* 1997: 51(5), 395-398.
- Steward DJ, Haining RL, Henne KR, Davis G, Rushmore TH, Trager WF, Rettie AE. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics* 1997: 7(5), 361-367.
- Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996: 6(5), 429-439.
- Suckow RF und Cooper TB. Determination of Trimipramine and Metabolites in Plasma by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *J Pharm Sci* 1984. 73(12), 1745-48.
- Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 1996: 6(4), 341-349.
- Takanashi K, Tainaka H, Kobayashi K, Yasumori T, Hosakawa M, Chiba K. CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics* 2000: 10(2), 95-104.
- Venkatakrishnan K, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Schmider J, Harmatz JS, Shader RI. Five distinct human cytochromes mediate amitriptyline N-demethylation *In-vitro*. *J Clin Pharmacol* 1998: 38(2), 112-121.
- Venkatakrishnan K, Schmider J, Harmatz JS, Ehrenberg BL, von Moltke LL, Graf JA, Mertzanis P, Corbett KE, Rodriguez MC, Shader RI, Greenblatt DJ. Relative contribution of CYP3A to amitriptyline clearance in humans: in vitro and in vivo studies. *J Clin Pharmacol* 2001: 41(10), 1043-1054.
- von Moltke LL, Greenblatt DJ, Duan SX, Schmider J, Wright CE, Harmatz JS, Shader RI. Human cytochromes mediating N-demethylation of fluoxetine *In-vitro*. *Psychopharmacology* 1997: 132(4), 402-7.

- Waldmeier PC. Effects of antidepressant drugs on dopamine uptake and metabolism. *J Pharm Pharmacol* 1982; **34**(6), 391-394.
- Whrighton SA, Stevens JC, Becker GW, VandenBranden M. Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 1993; **306**(1), 240-5.
- Wiegand M und Berger M. Action of Trimipramine on Sleep and Pituitary Hormone Secretion. *Drugs* 1989; **38 Suppl 1**, 35-42.
- Wolf CR und Smith G. Pharmacogenetics. *Br Med Bull* 1999; **55**(2), 366-386.
- Wrighton SA und Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992; **22**(1), 1-21.

Webseiten

- <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>. UT Memphis, Department Of Biochemistry 1993: Cytochrome P450 homepage.
- <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c9.htm>; Karolinska Institutet National Institute Of Environmental Medicine 1999: Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature committee.
- <http://medicine.iupui.edu/flockhart/>; UT Indiana, Department Of Medicine 2002: Cytochrome P450 drug int

Erklärung an Eides Statt

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen angefertigt und die der Literatur entnommenen Daten als solche gekennzeichnet habe.

Berlin, den 26. Oktober 2005

Gunnar Müller

Publikationsliste

Kirchheiner J, Meineke I, Müller G, Roots I, Brockmüller J. Contributions of CYP2D6, CYP2C9 and CYP2C19 to the biotransformation of E- and Z-doxepin in healthy volunteers. *Pharmacogenetics* 2002; 12(7), 571-80.

Kirchheiner J, Müller G, Meineke I, Wernecke KD, Brockmüller J. Effects of polymorphisms in CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 on trimipramine pharmacokinetics. *J Clin Psychopharmacol* 2003; 23(5), 459-66.